

# Entwicklung von Monolithen auf Basis polyfunktioneller Glycidylether für die Anwendung in der Affinitätschromatographie

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades

d o c t o r r e r u m n a t u r a l i u m

(Dr. rer. nat.)

im Fach Chemie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Dipl.-Chem. Heike Susanne Pecher

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. Jan-Hendrik Olbertz

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Prof. Stefan Hecht, Ph.D.

Gutachter/innen:

1. PD Dr. Michael G. Weller
2. Prof. Dr. Janina Kneipp

Tag der mündlichen Prüfung: 14. März 2014



*So eine Arbeit wird eigentlich nie fertig,  
man muss sie für fertig erklären, wenn man  
nach Zeit und Umständen das Mögliche getan hat.*

Johann Wolfgang von Goethe (1749-1832)





Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Juli 2010 bis September 2013 am Institut für Chemie der Humboldt-Universität zu Berlin und an der BAM Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung im Fachbereich 1.5 Proteinanalytik unter der Leitung von PD Dr. Michael G. Weller angefertigt.



# Danksagung

Bei der Anfertigung meiner Dissertation habe ich die Unterstützung und Hilfe Zahlreicher erfahren dürfen. Bei ihnen möchte ich mich auf den ersten Seiten dieser Arbeit herzlich bedanken:

Mein großer Dank gilt meinem Doktorvater PD Dr. Michael G. Weller, der es mir ermöglicht hat, meine Arbeiten auf dem Gebiet der Monolithe nach der Diplomarbeit im Rahmen meiner Promotion nahtlos weiterführen zu können. Danke für die zuverlässige und objektive Betreuung meiner Arbeit und die vielen Diskussionsrunden, in denen die Denkanstöße und Anregungen entstanden, die meine Arbeit voranbrachten.

Bei meinen Kollegen aus dem Fachbereich 1.5 Proteinanalytik Dr. Bogdan Bernevic, Almut Hesse, Oleg Klykov, Dr. Dörte Lohrberg, Dr. Wolfgang Pritzkow, Steffen Ramin, Astrid Walter und Shireen Weise bedanke ich mich für die kollegiale Zusammenarbeit und die besonderen Teamtage.

Shireen danke ich für die Aufnahme der Massenspektren an der Orbitrap und die MALDI-Messungen, aber vor allem für ihre gute Laune, die freiweg ansteckte. Ein Dankeschön an Dr. Franziska Diezmann für ihr sorgfältiges und kritisches Korrekturlesen dieser Arbeit. Ein lieber Dank gilt Astrid für ihre Hilfsbereitschaft, ihre ehrlichen Meinungen und besonders fürs Zuhören.

Meinen beiden Praktikanten Jessica Krause und Thomas Mühlbradt danke ich für ihre fleißige Mitarbeit an ihren jeweiligen kleinen Projekten und den Ergebnissen, die daraus resultierten.

Danke an meinen Bachelorstudenten Robert Tannenbergl für seine engagierte Mitarbeit im Rahmen seiner Praxisphase und Bachelorarbeit. In dieser Zeit sind durch Teamarbeit und konstruktive Diskussionsrunden viele gute Ideen entstanden, die meine Arbeiten bereichern haben.

Vielen Dank an meine Bürokollegen Stefanie Gärtner, Dr. Julia Grandke, Steffen Ramin und Astrid Walter für die angenehme Arbeitsatmosphäre, die vielen Gespräche und Dis-

## DANKSAGUNG

---

kussionen und den daraus entstandenen Ideen, für die gegenseitige Motivation, die erholsamen Mensa-Runden, zu denen auch Lidia Oberleitner und Martin Dippong gehörten und nicht zuletzt für die schönen privaten Unternehmungen.

Dr. José J. D. Carvalho danke ich rückblickend für die Betreuung eines Forschungspraktikums an der BAM während meines Studiums, nach dem ich mich für eine Diplomarbeit und im Anschluss schließlich für die Promotion an der BAM entschieden habe.

Annett Zimathies sei für die Quecksilber-Intrusionsporosimetriemessungen meiner ungezählten Monolithproben gedankt und für die Zeit, die sie sich für die Diskussion und Auswertung der Ergebnisse für mich genommen hat.

Prof. Dr. Klaus Rademann und Dr. Franziska Emmerling danke ich für die Bereitstellung des Environmental Scanning Electron Microscope sowie des Auflichtmikroskops. Dr. Steffen Weidner und Dr. Christian Piechotta danke ich für die zeitweise Bereitstellung ihrer HPLC-Anlagen. Nicole Langhammer sei für die Bereitstellung der Ultramikrowaage gedankt.

Den Firmen Raschig GmbH und Nagase (Europa) GmbH danke ich für die freundliche Bereitstellung der polyfunktionellen Glycidylether.

Dem Team der BAM-Bibliothek danke ich für ihre Recherche meiner zahlreichen Literaturwünsche in der Endphase meiner Arbeit.

Den beiden BAM-Werkstätten in Steglitz und Adlershof möchte ich für ihre handwerkliche Unterstützung danken. Namentlich sei stellvertretend an dieser Stelle Christoph Naese genannt. Der Glasbläserei Müller danke ich für die erfahrene Hilfe beim Entwurf und für die Anfertigung meiner speziellen Vakuumdestillationsapparatur.

Simone Rolf danke ich für die Aufnahme der Pulverdiffraktogramme, Dietmar Schulze für die Härtemessung, Dr. Jana Falkenhagen sei für die Aufnahme der Massenspektren zu Beginn meiner Promotion gedankt und Nadine Scheel für ihre Unterstützung bei den ersten Chromatographieexperimenten. Dem Arbeitskreis NMR-Spektroskopie an der HUB und Wolfgang Altenburg danke ich für die zügigen Messungen meiner NMR-Proben. Stefanie Gärtner sei für die Durchführung der ELISAs gedankt.

Juliane Schaefer und besonders Christin Heinrich verdanke ich viele Nerven, die ich sonst in der Bürokratie gelassen hätte. Danke an Christin auch für die nützlichen Tipps in Adlershof!

Danke an Anka Kohl für die stets schnelle technische Hilfe, wenn ich mit meinem Computer auf Kriegsfuß stand.

Dankend erwähnt seien auch die Fachbereiche 1.8 Immunanalytik unter der Leitung von Dr. Rudolf J. Schneider und 1.9 Sensormaterialien unter der Leitung von Dr. Knut Rurack, die mir im Laboralltag immer wieder mit Chemikalien und Geräten ausgeholfen haben.

Gerne werde ich mich an die „BAM-Band“-Auftritte auf den letzten beiden Sommerfesten erinnern. Die Proben, Improvisation und die Bandmischung waren einmalig! Danke an Dr. Bernhard Aichner, Dr. Merwe Albrecht, Alexandr Demidov, Nils Handelsmann, Sebastian Hein, Anna-Maria Matiaske, Ulrike Mülow, Pablo Quevedo, Dr. Jens Riedel und Simone Rolf.

Zu den schönsten Erlebnissen gehören die Teamstaffeln. Für die gute Stimmung und den Teamgeist bedanke ich mich bei meinen „Laufkollegen“ Stefanie Gärtner, Matthias Girod, Dr. Julia Grandke, Ulf Hansen, Mandy Hecht, Steffen Ramin, Franziska Rudolph und Shireen Weise.

Von ganzem Herzen danke ich meinen Eltern sowie meinen Brüdern Michael und Simon dafür, dass sie mich auf meinem Weg uneingeschränkt (be)stärken und ermutigen und dafür, dass ich mich immer auf sie verlassen kann. Ihnen ist diese Arbeit gewidmet.



# Kurzfassung

Monolithische Chromatographiephasen werden seit etwa 20 Jahren entwickelt und sind in den letzten Jahren eine attraktive Alternative zu etablierten mit Partikeln gefüllten Säulen geworden. Sie werden in anorganische Phasen und organische Polymermonolithe unterteilt, die beide kommerziell vertrieben werden. Poröse Monolithe bestehen aus einem einzigen, durchgehenden Stück. Charakteristisch ist das sie durchziehende Porennetzwerk, durch das der Eluent mit geringerem hydraulischen Widerstand fließen kann und das somit schnellere Flussraten ermöglicht. Polymermonolithe werden vorwiegend für die Separation großer Biomoleküle aufgrund eines durch Konvektion beschleunigten Massentransfers eingesetzt. Zudem sind sie über einen breiten pH-Wert-Bereich stabil und können direkt (*in situ*) im gewünschten Format polymerisiert werden.

In der vorliegenden Arbeit gelang die Herstellung neuartiger epoxidbasierter Phasen nach einem von WELLER et al. entwickelten Konzept, die im Affinitätsexperiment angewendet wurden. Die Herstellung erfolgte durch Autopolymerisation polyfunktioneller Glycidylether. Für die Funktionalisierung wurden nicht polymerisierte Epoxide genutzt. Als Monomere dienten Tris(2,3-epoxypropyl)isocyanurat (TEPIC), Glyceroltriglycidylether (GE 100) sowie Polyglycerolpolyglycidylether (GE 500). Die Arbeiten konzentrierten sich vor allem auf die bei Raumtemperatur durchführbaren Monolithsynthesen mit dem höher funktionellen GE 500. Die Polymerisationsbedingungen wurden hinsichtlich Porogenmischung und Porogenanteil optimiert. Eine mit 75 Vol.-% Porogen (1,4-Dioxan/Methyl-*tert*-butylether (MTBE) (2:3)) hergestellte und mit rekombinantem Protein A funktionalisierte Monolithkapillarsäule (66 % Porosität, 12  $\mu\text{m}$  Porengröße, 7  $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$  spezifische Oberfläche) ergab im Affinitätsexperiment eine Kapazität von 0,44  $\text{mg mL}^{-1}$  aus Kaninchenserum isolierbarem Immunglobulin G (IgG). Durch Beimischung von 60 % 1,3-Butadiendiepid (BDE) konnte der Epoxidgehalt vervierfacht und die Porengröße auf 400 nm bei 59 % Porosität reduziert werden. Die spezifische Oberfläche wurde verdreifacht und die Kapazität präparierter Disks auf 0,90  $\text{mg mL}^{-1}$  etwa verdoppelt. Die in dieser Arbeit entwickelten Disks können zur Isolierung von IgG aus einer komplexen Probe, wie beispielsweise Blutserum, eingesetzt werden.





# Abstract

Monolithic supports have been developed since 20 years and have become an attractive alternative to well-established columns packed with particles over the past years. They are classified into inorganic media and organic polymer monoliths, which are both commercially available. Porous monoliths consist of a single, continuous piece with an integrated characteristic porous network through which the eluent can flow with lower hydraulic resistance and which consequently offers higher flow rates. Due to an accelerated mass transfer caused by convection polymer monoliths are mainly used for separation of large biomolecules. In addition, they are stable over a wide pH range and can be polymerized directly (*in situ*) in the desired format.

In the present work the successful preparation of new epoxide-based supports according to a concept introduced by WELLER et al. as well as their application in affinity chromatography are reported. Their preparation was carried out by self-polymerization of polyfunctional glycidyl ethers and for functionalization non-polymerized epoxide groups were used. As monomers tris(2,3-epoxypropyl) isocyanurate (TEPIC), glycerol glycidyl ether (GE 100) and polyglycerol polyglycidyl ether (GE 500) were utilized. The work has focused especially on the polymerization of the higher functional GE 500, which can be performed at room temperature and was optimized in terms of both composition and amount of porogen. The extraction of immunoglobulin G (IgG) from rabbit serum with a capillary column (66 % porosity, 12  $\mu\text{m}$  pore size, 7  $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$  specific surface area) prepared by 75 vol.-% porogen (1,4-dioxane/methyl *tert*-butyl ether (MTBE) (2:3)) and functionalized with recombinant protein A resulted in a capacity of 0,44  $\text{mg mL}^{-1}$ . By addition of 60 % 1,3-butadiene diepoxide (BDE) the epoxide content was quadrupled and the pore size reduced to 400 nm while maintaining consistently high porosity of 59 %. The specific surface area was tripled and the capacity of prepared disks approximately doubled to 0,90  $\text{mg mL}^{-1}$ . The disks developed in this work can be applied for the isolation of IgG from complex samples such as serum.



# Inhaltsverzeichnis

<b>Danksagung</b>	<b>v</b>
<b>Kurzfassung</b>	<b>ix</b>
<b>Abstract</b>	<b>xi</b>
<b>1 Einführung</b>	<b>1</b>
<b>2 Theoretische Grundlagen</b>	<b>5</b>
2.1 Monolithische stationäre Phasen . . . . .	5
2.1.1 Historischer Überblick . . . . .	5
2.1.2 Eigenschaften . . . . .	7
2.1.3 Mechanismus der Porenbildung . . . . .	9
2.1.4 Monolithtypen . . . . .	12
2.2 Epoxidbasierte Monolithe . . . . .	15
2.2.1 Synthese und Reaktivität von Epoxiden . . . . .	15
2.2.2 Typen epoxidbasierter Monolithe . . . . .	18
2.2.3 Glycidylether - Synthesestrategien und Verwendung . . . . .	19
2.2.4 Mechanismen der Autopolymerisation von Epoxiden . . . . .	21
2.2.5 Methoden zur Bestimmung des Epoxidgehalts . . . . .	23
2.3 Methoden zur Charakterisierung von Monolithen . . . . .	24
2.3.1 Quecksilber-Intrusionsporosimetrie . . . . .	25
2.3.2 Gasadsorption . . . . .	28
2.3.3 Inverse Gel-Permeationschromatographie (ISEC) . . . . .	30
2.3.4 Environmental Scanning Electron Microscope (ESEM) . . . . .	33
2.3.5 Bestimmung der Härte nach SHORE . . . . .	34
2.3.6 Bestimmung der Proteinbindungskapazität . . . . .	34
2.4 Affinitätschromatographie . . . . .	35
2.4.1 Prinzip . . . . .	35

2.4.2	Ausgewählte Funktionalisierungstechniken . . . . .	38
<b>3</b>	<b>Experimentelles</b>	<b>43</b>
3.1	Chemikalien . . . . .	43
3.2	Puffer und Lösungen . . . . .	47
3.3	Analytische Methoden . . . . .	49
3.4	Geräte . . . . .	54
3.5	Verbrauchsmaterialien . . . . .	56
3.6	Synthese polyfunktioneller Glycidylether . . . . .	59
3.6.1	Pentaerythritoltetraglycidylether . . . . .	59
3.6.2	Glyceroltriglycidylether . . . . .	60
3.7	Monolithsynthese mit Tris(2,3-epoxypropyl)isocyanurat (TEPIC) . . . . .	61
3.7.1	Isomerenreine Aufreinigung . . . . .	61
3.7.2	Herstellung von Monolithkapillarsäulen . . . . .	62
3.7.3	Analytik . . . . .	63
3.8	Monolithsynthese mit GE 500, GE 100 und Monomergemischen . . . . .	64
3.8.1	Monolithsynthesen . . . . .	64
3.8.2	Analytik . . . . .	69
3.8.3	Herstellung und Anwendung monolithischer Phasen . . . . .	73
3.8.4	Proteinbindungskapazität . . . . .	79
<b>4</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion</b>	<b>81</b>
4.1	Synthese polyfunktioneller Glycidylether . . . . .	81
4.1.1	Pentaerythritoltetraglycidylether . . . . .	81
4.1.2	Glyceroltriglycidylether . . . . .	85
4.2	Monolithsynthese mit Tris(2,3-epoxypropyl)isocyanurat (TEPIC) . . . . .	87
4.2.1	Isomerenreine Aufreinigung von TEPIC . . . . .	88
4.2.2	Herstellung von Kapillarsäulen . . . . .	91
4.3	Monolithsynthese mit GE 100 und GE 500 . . . . .	100
4.3.1	Porogenscreening . . . . .	101
4.3.2	Variation des Porogenvolumenanteils . . . . .	107
	A Morphologie und Porosimetrie . . . . .	107
	B Härtebestimmung nach SHORE A . . . . .	111
4.3.3	Präparation von Kapillarsäulen und Disks . . . . .	112
4.3.4	Affinitätsexperimente . . . . .	115
4.4	Monolithsynthese mit Monomergemischen . . . . .	121
4.4.1	Bestimmung des Epoxidgehalts . . . . .	125

4.4.2	Variation des Diepoxidanteils und Härtebestimmung . . . . .	127
4.4.3	Morphologie und Porosimetrie . . . . .	130
4.4.4	Affinitätsexperiment . . . . .	136
4.4.5	Bestimmung der Proteinbindungskapazität . . . . .	138
4.5	Überblick über hergestellte monolithische Phasen . . . . .	142
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick</b>	<b>145</b>
	<b>Anhang</b>	<b>149</b>
	<b>Literatur</b>	<b>165</b>
	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>201</b>
	<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>204</b>
	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>205</b>
	<b>Publikationen</b>	<b>211</b>
	<b>Erklärung</b>	<b>213</b>



# Kapitel 1

## Einführung

Die Entwicklung monolithischer Phasen begann erst etwa Mitte der 1980er Jahre und dennoch finden sie heute als Alternative zu den seit etwa 100 Jahren etablierten mit Partikeln gefüllten Säulen in sämtlichen chromatographischen Techniken Anwendung<sup>[1]</sup>. Eingeteilt werden sie in anorganische, zumeist silicabasierte und im Sol-Gel-Prozess hergestellte Phasen, sowie in organische Polymermonolithe, von denen ein breites Spektrum an Zusammensetzungen und Polymerisationsarten beschrieben ist. Beiden Typen gemein ist, dass sie aus einem einzigen durchgehenden Stück bestehen, das von einem Porennetzwerk durchzogen ist, welches auch im trockenen Zustand aufgrund einer hohen Quervernetzung des Polymers bestehen bleibt. Ihre miteinander verbundenen und häufig mikrometergroßen Porenkanäle, durch die der Eluent fließt und die deshalb oft als Durchflusssporen bezeichnet werden, sind ihr Charakteristikum. Sie sorgen bei gleichzeitig hoher Porosität für einen geringeren hydraulischen Widerstand als bei Partikel gefüllten Säulen und erlauben somit höhere Flussraten. Anorganische Monolithe weisen im Gegensatz zu Polymermonolithen zusätzlich Poren in der Größe einiger Nanometer auf, die eine hohe Oberfläche erzeugen. Sie werden seit einigen Jahren u. a. von der Merck KGaA (Darmstadt) als Umkehrphasen für die Separation kleiner Moleküle<sup>[2]</sup> vertrieben. Polymermonolithe besitzen in der Regel hauptsächlich Durchflusssporen<sup>[3,4]</sup> und werden ergänzend besonders für die Separation großer Biomoleküle<sup>[5-8]</sup> wie beispielsweise für die von Proteinen eingesetzt.

Der Fokus der vorliegenden Arbeit liegt in der Entwicklung einer epoxidbasierten Monolithphase für die Affinitätschromatographie zur Anreicherung von Proteinen. Die Affinitätschromatographie ist die Methode der Wahl zur spezifischen Anreicherung von Biomolekülen und basiert auf der reversiblen Wechselwirkung eines Analyten mit einem auf der festen Phase immobilisierten Liganden. Geeignete Phasen müssen dafür vielen Anforderungen genügen. So müssen sie vor allem für drastische Elutionsbedingungen

über einen breiten pH-Wert-Bereich stabil sein und eine hohe Kapazität aufweisen. Außerdem müssen sie selbstverständlich funktionalisierbar sein. Etabliert sind bisher vor allem agarosebasierte Phasen, die diese Anforderungen erfüllen. Auch Polymermonolithen erfüllen diese, wobei ihre Kapazität in den meisten Fällen noch unterhalb der von agarosebasierten Phasen liegt. Nicht unwesentliche Nachteile agarosebasierter Phasen sind jedoch der hauptsächlich diffusionskontrollierte Massentransfer und eine geringe Druckstabilität, die beide die Flussgeschwindigkeit limitieren. Der Massentransfer bei Polymermonolithen zu den an der Oberfläche der Durchflusssporen befindlichen aktiven Zentren erfolgt hingegen vor allem durch schnellere Konvektion<sup>[8-10]</sup>. Die schnellere Bindungskinetik limitiert somit nicht die aufgrund der porösen Struktur möglichen höheren Flussraten. Dadurch sind höhere Durchsätze in kürzerer Zeit möglich. Polymermonolithen sind *in situ* herstellbar, d. h. die Reaktionslösung polymerisiert direkt in der gewünschten Kartuschenform. Dadurch sind sie in jeglicher Form herstellbar.

Epoxidbasierte Phasen sind variabel einsetzbar, weil sie sich mit dem nukleophilen Liganden der Wahl funktionalisieren lassen. Bisher wurden sie zum einen durch Polykondensation eines Epoxidmonomers mit einem Amin und zum anderen überwiegend durch Radikalkettenpolymerisation der Monomere Glycidylmethacrylat (GMA) und Ethylen-dimethacrylat (EDMA) hergestellt. GMA/EDMA-Monolithen werden bereits von BIA Separations d.o.o. (Ajdovščina, Slovenien) vertrieben.

In der vorliegenden Arbeit wird die Weiterentwicklung eines neuen Konzepts verfolgt, von dem WELLER et al.<sup>[11]</sup> erstmals berichteten und das bereits zur Anreicherung von Bakterien erfolgreich eingesetzt wurde<sup>[12,13]</sup>. Hierbei wird der Monolith durch LEWIS-Säure-katalysierte Autopolymerisation polyfunktioneller Glycidylether, die großtechnisch als Vernetzer in Epoxidharzen verwendet werden, hergestellt. Nicht polymerisierte Gruppen werden für die anschließende Funktionalisierung genutzt.

Der Schwerpunkt der Arbeit liegt in der Recherche nach geeigneten polyfunktionellen Glycidylethern und der Optimierung der Materialeigenschaften hinsichtlich der Porengröße, Porosität, spezifischen Oberfläche und Rigidität des Materials. Dazu wurde der Einfluss der Porogenmischung und des Porogenanteils sowie die Beimischung von Di-epoxiden als Comonomer untersucht. Außerdem umfassen sie die Entwicklung der Präparation von monolithischen Kapillarsäulen und Disks. Eine geeignete Phase für die Anreicherung von Proteinen, insbesondere von ca. 10 nm großen Antikörpern, sollte Poren in der Größenordnung einiger hundert Nanometer und für eine zugleich gute Permeabilität eine Porosität von mehr als 50 % aufweisen. Im Folgenden werden die Ergebnisse der Monolithsynthese mit den drei Monomeren Tris(2,3-epoxypropyl)isocyanurat (TEPIC), Glyceroltriglycidylether (GE 100) sowie Polyglycerolpolyglycidylether (GE 500) diskutiert. Zuerst wird aber ein Überblick über die Vielfalt bisher hergestellter monolithischer



Materialien, deren Herstellungsprozesse und über gängige analytische Methoden zu deren Charakterisierung gegeben. Dabei wird insbesondere auf Epoxide und deren Reaktivität eingegangen.



# Kapitel 2

## Theoretische Grundlagen

### 2.1 Monolithische stationäre Phasen

Monolithische stationäre Phasen stellen mittlerweile in zahlreichen Chromatographie-techniken, nicht nur in der Affinitätschromatographie, eine Alternative zu den konventionellen Phasen dar, bei denen es sich zumeist um Partikel bzw. speziell im Fall der Affinitätschromatographie um gequollene auf Agarose basierende Gele handelt. Im Folgenden werden die Eigenschaften und die sich daraus ergebenden Vorteile monolithischer Phasen gegenüber konventionellen Säulenbetten beschrieben und eine Übersicht über die Vielfalt an Monolithtypen gegeben, die bisher entwickelt wurden. Außerdem wird der Herstellungsprozess im Allgemeinen erläutert, durch den das charakteristische Porennetzwerk in den Monolith integriert wird und es werden Einflüsse diskutiert, die die Porengröße steuern. Eingangs wird aber zunächst ein historischer Überblick über die Anfänge und Entwicklung monolithischer Phasen gegeben.

#### 2.1.1 Historischer Überblick

In den 1950er Jahren entwickelte der Nobelpreisträger ROBERT SYNGE<sup>[14]</sup> erstmals ähnliche zu den heute als Monolithe bekannten Strukturen<sup>[15]</sup>, indem er kolloidumbasierte Membranen für die Ultrazentrifugation von Polysacchariden einsetzte<sup>[16,17]</sup>. Ein Jahrzehnt später veröffentlichten KUBÍN et al.<sup>[18]</sup> ihre Ergebnisse zu Experimenten mit Polyethylenglycolmethacrylaten als stationäre Phasen für die Gelfiltration. Diese Materialien waren jedoch nicht ausreichend druckstabil<sup>[15,19]</sup> und es folgten Versuche mit offenporigen Polyurethanschäumen, die erste erfolgsversprechende Ergebnisse hinsichtlich guter Trennleistungen kleiner Moleküle in der Gas- (GC) und Flüssigchromatographie (engl. *Liquid Chromatography*, LC) zeigten<sup>[19–24]</sup>. Sie waren allerdings für eine Anwendung als stationäre Phase in der GC nicht ausreichend thermisch stabil<sup>[19]</sup> und wiesen für einen

Durchbruch in der LC eine noch zu geringe mechanische Stabilität und ein zu starkes Quellverhalten auf<sup>[25]</sup>.

Mitte der 1980er Jahre stellte die Gruppe um BELENKII<sup>[26,27]</sup> nach Experimenten mit unterschiedlichen Säulengeometrien für die Separation von Proteinen fest, dass auch kurze Säulen für eine erfolgreiche Trennung ausreichend sind. Kurze, mit Partikeln gefüllte Säulen konnten jedoch nicht homogen und spaltenfrei hergestellt werden<sup>[15]</sup>. Dieser Zeitpunkt gilt als Geburtsstunde der Monolithe<sup>[15]</sup>, nachdem TENNIKOVA<sup>[28]</sup> und ihren Mitarbeitern durch Copolymerisation von Glycidylmethacrylat (GMA) und Ethylendimethacrylat (EDMA) die Synthese eines porösen, aus einem Stück bestehenden Trägermaterials mit zentimetergroßen Durchmessern im Diskformat gelang.

ŠVEC et al.<sup>[29]</sup> übertrugen die Technik auf die *in-situ*-Synthese monolithischer Säulen in konventioneller Dimension für die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl. *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) und setzten als weitere Monomere Styrol, Divinylbenzol und deren Derivate ein<sup>[30]</sup>. Die Ausbildung von Spalten zwischen Monolith und Säulenwand durch Schrumpfung des Polymers wurde durch eine senkrechte Position der Säule während der Polymerisation vermieden. Dadurch sedimentiert das Polymer und der Feststoff wird von der Polymerisationslösung umgeben, sodass entstandene Spalten mit Feststoff wieder ausgefüllt werden<sup>[30]</sup>. Die einfache Herstellung und eine gute Trennleistung für Biomoleküle weckten das Interesse für diese Materialien<sup>[25]</sup>.

Parallel zu diesen Arbeiten stellten HJERTÉN et al.<sup>[31–33]</sup> gequollene und stark vernetzte Gele durch Reaktion von *N,N'*-Methylenbisacrylamid mit u. a. Acrylsäure in Gegenwart von Salzen wie Ammoniumsulfat und Ammoniumperoxodisulfat her, die nach der Synthese komprimiert wurden und trotzdem eine hohe Permeabilität aufwiesen. Ab Anfang der 1990er Jahre wurden zahlreiche weitere Synthesen für monolithische Materialien in verschiedenen Säulengeometrien und mit unterschiedlichen Funktionalitäten für die HPLC und Kapillarelektrochromatographie (engl. *Capillary Electrochromatography*, CEC) publiziert<sup>[3,15,34–40]</sup>.

Nachdem sich die Entwicklung hauptsächlich auf die Synthese organischer Polymermonolithe konzentriert hatte, führten die Gruppen um TANAKA<sup>[2]</sup> und FIELDS<sup>[41]</sup> Mitte der 1990er Jahre anorganische Monolithe auf Silicabasis ein. Im Gegensatz zu Polymermonolithen schrumpfen Silicamonolithe stark und können nicht *in situ* hergestellt werden. Sie werden heute nach dem Verfahren von TANAKA et al. im Sol-Gel-Prozess durch Polymerisation von Tetramethoxysilan (TMOS) oder Tetraethoxysilan (TEOS) in Polyethylenglycol (PEG) als Porogen hergestellt<sup>[42,43]</sup>.

### 2.1.2 Eigenschaften

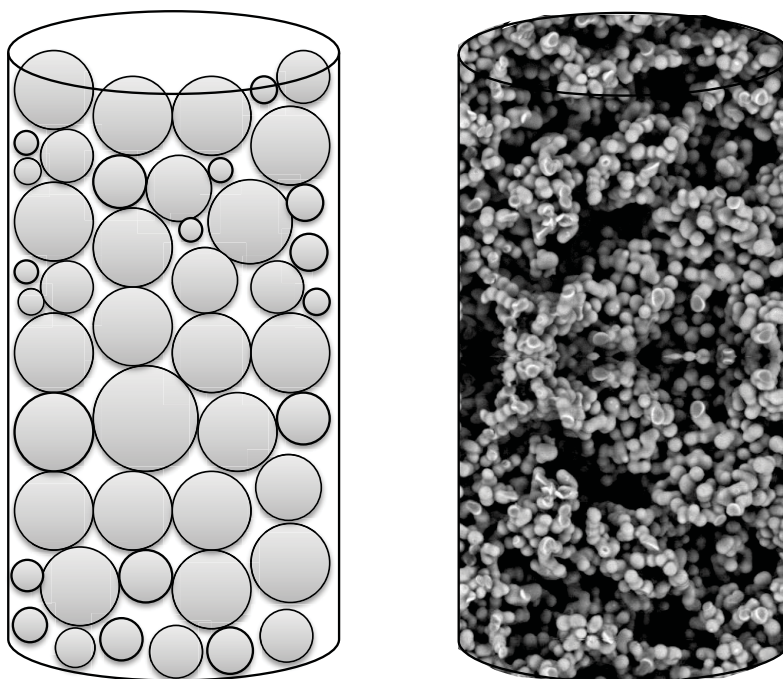
Seit mehr als 100 Jahren werden in der Chromatographie hauptsächlich mit porösen Partikeln gepackte Säulen eingesetzt<sup>[15]</sup>. Ihre spezifische Oberfläche wird durch die intrapartikuläre Porosität bestimmt, während die interpartikuläre Porosität, in der Größenordnung einiger Zehntel der Partikelgröße, die Permeabilität der Säule beeinflusst<sup>[3]</sup>. Auch bei enger Partikelgrößenverteilung und homogener Packungsdichte weisen gepackte Säulen ein Hohlraumvolumen von 30-40 % auf, das für die chromatographische Trennung nicht zur Verfügung steht<sup>[3,15]</sup>. Der Massentransfer der zu trennenden Analyten geschieht durch Diffusion in die Partikelporen aufgrund eines sich ausbildenden Konzentrationsgradienten zwischen dem durch die Partikelzwischenräume fließenden und dem in den Partikelporen stagnierenden Eluenten und kann durch kurze Diffusionswege beschleunigt werden. Dies ist vor allem für große Biomoleküle wie Proteine von Vorteil, weil sie einen erheblich kleineren Diffusionskoeffizienten als niedermolekulare Moleküle besitzen<sup>[15,44]</sup>. Bei Verwendung kleinerer Partikel verkleinern sich simultan aber auch die Partikelzwischenräume und die resultierende Reduzierung der Permeabilität hat höhere Gegendrücke zur Folge<sup>[15]</sup>. Nach dem DARCY-Gesetz (Gleichung 2.1) verhält sich der Gegendruck  $\Delta p$  bei laminaren Strömungen, unter Berücksichtigung der Säulenlänge  $L$ , der Flussgeschwindigkeit  $u$ , der Viskosität der mobilen Phase  $\eta$  und der Konstante  $K_0$ , dabei umgekehrt proportional zum Quadrat der Partikelgröße  $d_p$ <sup>[45]</sup>:

$$\Delta p = \frac{u \cdot \eta \cdot L}{K_0 \cdot d_p^2}. \quad (2.1)$$

Die Permeabilitätskonstante  $K_0$  berechnet sich nach der KOZENY-CARMAN-Gleichung aus der externen Porosität  $\epsilon_e$ :

$$K_0 = \frac{\epsilon_e^3}{180(1 - \epsilon_e)^2}. \quad (2.2)$$

Monolithische Phasen stellen eine Alternative zu diesen seit langem etablierten Säulen dar. Sie bestehen, wie der Name vermuten lässt, aus einem durchgehenden Säulenbett und werden in anorganische Materialien, die hauptsächlich silicabasiert sind und organische Polymermonolithe, die im Folgenden nur noch als Polymermonolithe bezeichnet werden, eingeteilt. Strukturell sind sie zumeist aus Kügelchen, die zu größeren Clustern vernetzt sind, aufgebaut. Charakteristisch ist das sie durchziehende Porennetzwerk, durch das der Eluent fließen kann. Die Poren sind typischerweise einige Mikrometer groß und werden aufgrund ihrer Funktion in der Literatur als Durchfluss- oder aufgrund ihrer Größe auch als Gigaporen bezeichnet<sup>[15,25]</sup>. GUIOCHON<sup>[3]</sup> beschreibt die monolithische Struktur durch Umkehrung der einer mit Partikeln gefüllten Säule. An-



**Abbildung 2.1.** Vergleich des Säulenbetts einer mit Partikeln gefüllten Säule (links) mit dem einer monolithischen Säule (rechts).

stelle der Partikelzwischenräume tritt das monolithische Skelett und anstelle der Partikel die Durchflusssporen, deren Verbindungen die Kontaktflächen zwischen den Partikeln darstellen. HUBER UND ŠVEC<sup>[15]</sup> vergleichen die Struktur indessen mit nur einem einzigen großen porösen und von den Poren vollständig durchdrungenen Partikel, wie er in der Perfusionschromatographie eingesetzt wird. In Abbildung 2.1 ist der Aufbau beider Säulenbettformate schematisch illustriert. Die Porosität monolithischer Phasen beträgt im Allgemeinen ca. 60-80 %, weshalb sie eine erhöhte Permeabilität aufweisen. Sie wird durch die Vernetzung, Konstruktion und Form der Poren beeinflusst und erlaubt aufgrund eines geringeren hydraulischen Widerstands höhere Flussraten, wodurch die Analysenzeit verkürzt wird. Der Massentransfer erfolgt dabei neben Diffusion auch durch Konvektion<sup>[8-10]</sup>.

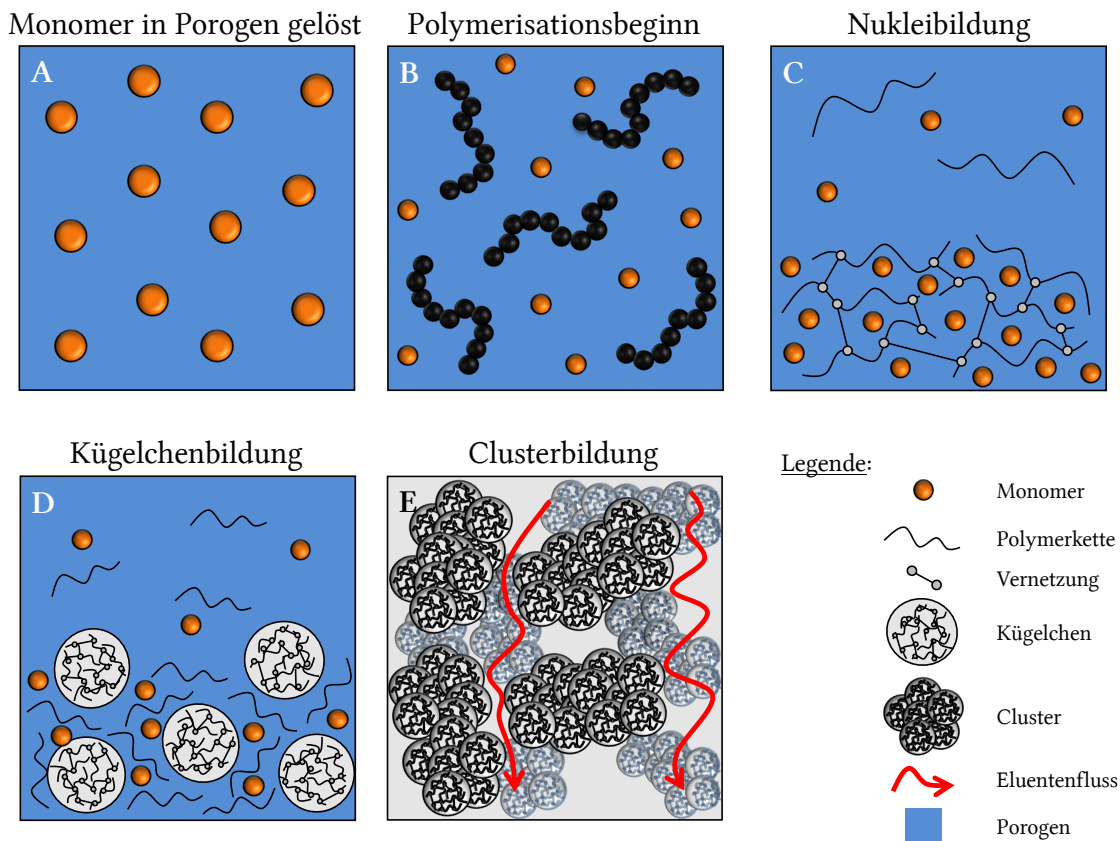
Im Vergleich zu mit Partikeln gepackten Säulen beträgt das vom monolithischen Skelett ausgefüllte Volumen folglich aber nur 40-20 %, sodass die spezifische Oberfläche kleiner als die von mit Partikeln gepackten Säulen sein müsste. Anorganische Monolithe besitzen neben den Durchflusssporen zusätzlich kleine Einbuchtungen in den Kugeln<sup>[25]</sup>, die nach Definition der International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC)<sup>[46]</sup> in der Größenordnung von Mesoporen (2-50 nm) liegen und für eine hohe spezifische Oberfläche sorgen<sup>[3]</sup>. Die Porengrößen können unabhängig voneinander im Herstellungsprozess eingestellt werden<sup>[42]</sup>. Dabei muss für die jeweilige Anwendung der Säule

ein Optimum zwischen einer hohen spezifischen Oberfläche für eine hohe Kapazität und gute Trennleistung sowie einer hohen Permeabilität für geringe Gegendrücke und hohe Flussraten erzielt werden. Eine multimodale Porengrößenverteilung ist denkbar, aber nicht immer wünschenswert, da Mikroporen ( $< 2 \text{ nm}$ ) für größere Moleküle zu klein sind und der Massentransfer durch stärkere Adsorptionseffekte langsamer erfolgt<sup>[3]</sup>. Für Polymermonolithe konnte diese bimodale Porengrößenverteilung bisher nicht realisiert werden<sup>[3,4]</sup>, weshalb sie überwiegend für die Trennung großer Biomoleküle<sup>[5–8]</sup> und anorganische Monolithe komplementär für die Trennung kleinerer Moleküle eingesetzt werden<sup>[2]</sup>. Aufgrund des hohen Vernetzungsgrades besitzen Monolithe eine hohe, von der Porosität abhängige, mechanische Stabilität, die dafür sorgt, dass die Porosität auch im trockenen Zustand erhalten bleibt<sup>[25]</sup>.

Polymermonolithe zeichnen sich zudem im Gegensatz zu Silicamonolithen durch Stabilität über einen breiten pH-Wert-Bereich aus und können *in situ* in unterschiedlichsten Formen polymerisiert werden. Es wurden konventionelle HPLC-Formate<sup>[47]</sup>, Kapillarsäulen<sup>[48–52]</sup>, Diskformate<sup>[53,54]</sup> und mikrofluidische Kanäle<sup>[55,56]</sup> hergestellt<sup>[8]</sup>. Silicamonolithe schrumpfen so stark, sodass sie nachträglich in die Säule eingekapselt werden müssen. Untersuchungen zur Schrumpfung von Silicamonolithen in Abhängigkeit des Säuleninnendurchmessers zeigten, dass Monolithe in Kapillarsäulen mit einem kleineren Innendurchmesser als  $100 \mu\text{m}$  an der Säulenwand haften bleiben<sup>[3]</sup>. Polymermonolithe sind flexibler, sodass eine Schrumpfung durch mechanischen Stress und die resultierende Spaltenbildung zwischen Säulenwand und Monolith nicht so stark wie bei Silicamonolithen eintritt<sup>[3]</sup>.

### 2.1.3 Mechanismus der Porenbildung

Der Mechanismus<sup>[57]</sup> für die Herstellung poröser Partikel und poröser Monolithe basiert auf der Phasenseparation<sup>[57–62]</sup> des Polymers während der Polymerisation aus einem inerten Lösungsmittel, Porogen genannt. Die Herstellungsprozesse unterscheiden sich dabei jedoch. Poröse Partikel werden meist nach einer in den 1950er Jahren entwickelten Technik mittels Suspensionspolymerisation hergestellt<sup>[63]</sup>. Dabei wird ein wasserunlösliches Monomer in einer wässrigen Phase dispergiert und die entstandenen Tröpfchen durch Zugabe eines im Monomer löslichen Initiators zu sphärischen Partikeln polymerisiert. Die Suspension wird während der gesamten Polymerisationsdauer gerührt. Die Stärke des Rührens und die Grenzflächenspannung zwischen organischer und wässriger Phase beeinflussen die Größe und sphärische Form der Partikel<sup>[64,65]</sup>. Im Gegensatz dazu ist die Polymerisation von Monolithen statisch<sup>[30,39,66]</sup> und wird in der Regel direkt im Porogen durchgeführt<sup>[67]</sup>.



**Abbildung 2.2.** Mechanismus der Phasenseparation.

Der Mechanismus der Porenbildung ist in Abbildung 2.2 veranschaulicht. Das Monomer wird im Porogen gelöst (A) und die Polymerisation durch einen Initiator gestartet (B). Das Porogen enthält einen für die gebildeten Polymerketten unlöslichen Anteil, der zur Phasenseparation führt. Wie in einer Fällungspolymerisation präzipitiert das gebildete Polymer und sedimentiert aufgrund seiner größeren Dichte<sup>[60,68]</sup>. Die Vernetzung der Polymerketten zu sogenannten Nuklei, die eine hoch poröse ungeordnete Struktur ausbilden, fördert diesen Prozess zusätzlich (C). Sie stellen für das Monomer ein thermodynamisch besseres Lösungsmittel dar, infolgedessen sich die lokale Monomerkonzentration zwischen den Nuklei erhöht und die weitere Polymerisation dort kinetisch bevorzugt ist. Polymerketten, die weiterhin in Lösung entstehen, werden von den zu Kügelchen anwachsenden Nuklei aufgenommen (D). Diese vernetzen untereinander und verschmelzen schließlich zu Clustern<sup>[58]</sup> (E). Die Ausbildung eines vernetzten Polymers ist für die mechanische Stabilität des Monoliths wichtig und sorgt dafür, dass das Porennetzwerk auch im trockenen Zustand erhalten bleibt<sup>[63]</sup>. Das Porogen wird während der Phasenseparation zwischen den Kügelchen eingeschlossen. Diese Zwischenräume stellen das spätere Porennetzwerk dar<sup>[28,58]</sup>, aus dem nach der Synthese das Porogen



verdampft oder herausgewaschen wird. Im Idealfall, wenn das gesamte Porogen vom Polymer eingeschlossen wird, entspricht der eingesetzte Porogenvolumenanteil der Porosität im Monolith. Bei der Suspensionspolymerisation lässt das Rühren der Lösung die Nuklei in den Tropfen rotieren. Dadurch verschmelzen sie später und werden enger gepackt. Aufgrund dessen sind die Poren in porösen Partikeln unter gleichen Reaktionsbedingungen hinsichtlich Reaktionszeit, -temperatur und Zusammensetzung der Mischung kleiner als in Monolithen<sup>[30,58,66]</sup>.

Die Porengröße und damit auch die spezifische Oberfläche sowie die Homogenität und Rigidität können durch die Reaktionstemperatur, den Anteil an Vernetzer, die Art<sup>[69]</sup> und Konzentration des Initiators, aber vor allem durch die Porogenzusammensetzung und deren Anteil gesteuert werden<sup>[30,63,66,70–78]</sup>. Dabei ändert nur der Anteil an Vernetzer die chemische Zusammensetzung des Monoliths. Das bedeutet, dass durch Variation der anderen Faktoren Polymere gleicher Zusammensetzung, aber mit unterschiedlichen Porengrößen hergestellt werden können<sup>[79,80]</sup>.

Das Porogen beeinflusst die Porengröße durch sein Vermögen, die gebildeten Polymerketten zu Beginn der Polymerisation zu lösen<sup>[36,66,81]</sup>. Tritt die Phasenseparation schnell ein, wachsen die Nuklei durch die lokal erhöhte Monomerkonzentration zwischen ihnen schnell zu großen Kügelchen und Clustern heran, zwischen denen sich größere Zwischenräume ausbilden. Ist das Porogen aber ein dazu relativ gutes Lösungsmittel, konkurriert es mit dem Monomer um die Solvation des Polymers und die Phasenseparation tritt verzögert ein. Es bilden sich mehrere kleinere Nuklei, die bei gleicher Monomerkonzentration wie im oberen Fall zu kleineren Clustern mit kleineren Zwischenräumen anwachsen<sup>[30,36,66]</sup>. Die Porogenzusammensetzung und -menge muss für jede Monomermischung empirisch bestimmt werden, eine präzise Vorhersage der Porengröße ist bisher nicht möglich<sup>[1,58,63]</sup>. Als Porogene können prinzipiell alle Lösungsmittel eingesetzt werden. Für polymethacrylatbasierte Monolithe beispielsweise werden häufig niedermolekulare Alkohole<sup>[82,83]</sup> wie z. B. Cyclohexanol und Dodecanol<sup>[36]</sup> verwendet, die gewöhnlich in binären<sup>[79,84]</sup>, aber auch in Verbindung mit Wasser in ternären Mischungen<sup>[85]</sup> eingesetzt werden. Daneben wurden Synthesen auch in polymeren Porogenen<sup>[86]</sup> wie PEGs ( $M = 4000\text{--}20\,000\text{ g mol}^{-1}$ )<sup>[87]</sup> und Polystyrolen<sup>[69]</sup> sowie in 1,1,1,2-Tetrafluorethan<sup>[88]</sup> und überkritisches Kohlenstoffdioxid<sup>[89,90]</sup>, mit denen sich die Porengröße über den Druck steuern lässt, durchgeführt. Durch die mögliche Anpassung des Porogens können im Gegensatz zur Suspensionspolymerisation bei der Herstellung von Monolithen Monomere unterschiedlichster Polaritäten copolymerisiert werden<sup>[76,83,91]</sup>. Von der Art des Initiators hängt zumeist die optimale Reaktionstemperatur ab<sup>[92]</sup>. Diese übt wie die Initiatorkonzentration einen Einfluss auf die Reaktionskinetik der Polymerisation aus<sup>[58,63]</sup>. Allgemein gilt, dass mit steigender Temperatur und Initiatorkonzen-

tration die Porengröße abnimmt<sup>[63,66]</sup>, weil schnell zahlreiche und damit kleinere Nuklei bzw. Kügelchen und Cluster mit kleineren Zwischenräumen gebildet werden. Die Mischung des Polymers mit dem Porogen ist faktisch ein endothermer Prozess, wonach mit steigender Temperatur die Löslichkeit des Polymers im Porogen zunehmen und die Phasenseparation verzögert eintreten müsste. Die Poren müssten entsprechend größer sein. Da aber der gegenteilige Effekt beobachtet wird, scheint die Temperatur auf das thermodynamische Löslichkeitsvermögen des Porogens für das Polymer keinen dominierenden Einfluss zu haben. Bei geringerer Initiatorkonzentration sinkt die Polymerisationsgeschwindigkeit und die Diffusion der Monomermoleküle in das Nukleigerüst ist begünstigt, die hiernach zu größeren Clustern mit größeren Zwischenräumen anwachsen<sup>[63]</sup>. Vor allem bei Präparation im Durchmesser größerer Monolithe können Temperaturgradienten während der exothermen Polymerisation in der ungerührten Lösung eine heterogene Porenstruktur verursachen<sup>[4]</sup>, die die Effizienz einer Säule reduziert. Für Silicamonolithe ist dies bekannt und in der Literatur beschrieben<sup>[3]</sup>, für kommerziell erhältliche Polymermonolithe durch numerische Simulation berechnet<sup>[93]</sup>. Dabei wurden bevorzugte Pfade, horizontale Poren und stagnierende Zonen ermittelt.

Der Anteil an Vernetzer limitiert die Porengröße durch das Maß an möglicher Verknüpfung der Kügelchen. Mit steigendem Anteil nimmt die Porengröße ab. Sind die Kügelchen intern schon hoch vernetzt, können sie sich nicht mehr zu großen Clustern verknüpfen, sodass die Zwischenräume klein bleiben<sup>[58,66]</sup>. Das hat eine höhere spezifische Oberfläche, aber auch eine Reduzierung der Permeabilität zur Folge.

### 2.1.4 Monolithtypen

Monolithische Phasen werden in anorganische und organische Materialien unterteilt. Anorganische Phasen sind hauptsächlich silicabasiert. Ihre Entwicklung begann in den 1990er Jahren<sup>[94–96]</sup> und bereits 1993 reichten NAKANISHI und SAGA und die Merck KGaA (Darmstadt) unabhängig voneinander Patente für ihre Herstellung ein<sup>[25]</sup>. Kommerziell sind sie heute von Merck unter dem Handelsnamen Chromolith®<sup>[97,98]</sup> und von Phenomenex Inc. (Aschaffenburg) unter dem Handelsnamen Onyx™ erhältlich. Sie werden nach dem Verfahren von TANAKA et al. im Sol-Gel-Prozess hergestellt, der aus der Hydrolyse von Alkoxysilanen und einer exothermen Silanolkondensation besteht<sup>[43,97,99]</sup>. Als Monomere werden TMOS und TEOS mit unterschiedlichen Additiven<sup>[43]</sup> in PEGs<sup>[100]</sup> als Porogen umgesetzt. Durch eine bimodale Porengrößenverteilung mit Poren im Größenbereich von 1-2 µm und 5-25 nm besitzen sie eine spezifische Oberfläche von 200-400 m<sup>2</sup> g<sup>-1</sup>. Die Porengrößen lassen sich dabei unabhängig voneinander einstellen, wobei die Mesoporen durch eine nach der Polymerisation durchgeführten Alterung im Basi-

schen entstehen<sup>[96,101]</sup>. Temperatur und pH-Wert beeinflussen dabei die Porengrößenverteilung und mittlere Porengröße. Silicabasierte Monolithe sind nur über einen pH-Wert-Bereich von ca. 2-8 stabil<sup>[102]</sup> und können aufgrund einer hohen Schrumpfung während des Herstellungsprozesses nicht *in situ* hergestellt werden<sup>[103]</sup>, zeichnen sich aber durch eine hohe mechanische Stabilität aus.

Zu neuartigeren anorganischen Monolithen gehören Metalloxidmonolithe, die über einen breiteren pH-Bereich einsetzbar sind. Sie werden in einer Polykondensation von Aluminium-, Hafnium- oder Zirkoniumoxiden mit *N*-Methylformamid in Propylenoxid als Porogen *in situ* hergestellt<sup>[104]</sup>. Allerdings zeigten sie in Experimenten in der Normalphasen-Flüssigchromatographie (NP-LC) ein starkes Peak tailing. Daneben stellten TAGUCHI et al.<sup>[105]</sup> und LIANG et al.<sup>[106]</sup> Kohlenstoffmonolithe her. Dafür polymerisierten sie Furfurylalkohol um einen Silicamonolith bzw. betteten Silicapartikel in einem Phenolharz, bestehend aus Formaldehyd und einem Resorcin-Eisen(III)-Komplex, ein. Die das Silica ummantelnden Monolithe wurden in einer Pyrolyse bei 800 bzw. 1250 °C karbonisiert. Das Silicagerüst wurde anschließend unter Einwirkung von Flusssäure entfernt.

Polymermonolithe werden überwiegend durch Copolymerisation eines mono- und bifunktionellen Monomers in Anwesenheit eines Initiators und eines Porogens hergestellt. Bei Radikalkettenpolymerisationen ungesättigter Verbindungen erfolgt die Initiierung vorwiegend thermisch oder photochemisch<sup>[8]</sup>. Daneben werden seltener auch  $\gamma$ -Strahlen oder Elektronenstrahlen eingesetzt<sup>[1,19]</sup>. Als Monomere dienen zumeist Styrol, Acrylate und Acrylamide. Die spezifische Oberfläche dieser Monolithe ist jedoch durch das Fehlen von Mesoporen im Gerüst geringer als die von Silicamonolithen.

Styrolbasierte Monolithe werden mit Divinylbenzol als Vernetzer hergestellt und haben einen hydrophoben Charakter. Sie werden unfunktionalisiert in der Umkehrphasenchromatographie (engl. *Reversed-Phase Chromatography*, RP) eingesetzt, können aber auch mittels Friedel-Crafts-Alkylierung C18-funktionalisiert werden. Sie wurden erfolgreich für Trennungen von Proteinen und Peptiden<sup>[107–109]</sup>, Polystyrol-Standards<sup>[110]</sup> und kleinen Molekülen wie Alkylbenzolen<sup>[111]</sup> eingesetzt.

Für die Synthese acrylatbasierter Monolithe stehen viele Monomere zur Verfügung, so dass Monolithe mit unterschiedlichsten Eigenschaften und Funktionalitäten hergestellt werden können<sup>[112]</sup>. Monolithe, bestehend aus dem Copolymer Poly(butylmethacrylat-co-ethylendimethacrylat) (BMA/EDMA) bzw. Poly(GMA-co-EDMA), werden in der RP-LC für die Proteintrennung<sup>[112]</sup> eingesetzt bzw. sind für zahlreiche Anwendungen durch funktionalisierbare Epoxidgruppen geeignet. GMA/EDMA-Monolithe sind als Convective Interaction Media (CIM®) in Disk- und Säulenformat kommerziell bei BIA Separations d.o.o. (Ajdovščina, Slovenien) erhältlich. Sie werden für die Trennung von Prote-

inen und Oligonukleotiden<sup>[113]</sup> sowie für die Aufreinigung von Proteinen und Plasmid-Desoxyribonukleinsäure (DNS)<sup>[114–116]</sup> eingesetzt. Als Porogene werden Cyclohexanol und Dodecanol und als Initiator zur thermischen Initiierung Azo-*bis*(isobutyronitril) (AIBN) eingesetzt<sup>[117]</sup>. Hydrophile acrylamidbasierte Monolithe werden durch Copolymerisation von Acrylsäure und *N,N'*-Methylenbisacrylamid in wässrigem Puffer als Porogen hergestellt<sup>[31]</sup>. Sie werden aufgrund ihrer Polarität in der NP-LC eingesetzt. Hydrophobe Acrylamid-Monolithe lassen sich durch Ersatz von Acrylsäure durch Butylmethacrylat synthetisieren<sup>[32]</sup>. Sie waren allerdings nicht druckstabil, sodass die Kapillaren für eine kovalente Anbindung silanisiert wurden und die Monolithe durch Polymerisation von Methacrylamid, Acrylsäure und Piperazindiacrylamid optimiert wurden. Anwendung finden sie in der Proteintrennung<sup>[118]</sup>.

Neben der Radikalkettenpolymerisation wurden auch Techniken für die Monolithsynthese mittels lebender Polymerisation entwickelt. Dazu zählen zum einen Poly(styrol-*co*-divinylbenzole), die unter Einsatz von 2,2,6,6-Tetramethylpiperidinyloxy (TEMPO) synthetisiert werden<sup>[119]</sup> und zum anderen die von BUCHMEISER et al.<sup>[19,120–125]</sup> entwickelte Polymerisation von Norbornen und Derivaten mit einem GRUBBS-ähnlichen Rutheniumkatalysator durch eine Ringöffnungsmetathese (engl. *Ring-Opening Metathesis Polymerisation*, ROMP). Die hydrophoben Monolithe wurden im Säulen- und Kapillarsäulenformat hergestellt und finden in der Trennung von Biopolymeren<sup>[125–128]</sup> und im Hochdurchsatzscreening<sup>[124]</sup> synthetischer Polymere Anwendung. ROMP wurde Mitte der 1970er Jahre entwickelt<sup>[129]</sup> und die Entwicklungsarbeit im Jahr 2005 mit einem Nobelpreis an CHAUVIN, GRUBBS und SCHROCK<sup>[130]</sup> ausgezeichnet. Der Versuch Mitte der 1990er Jahre von MATYJASZEWSKI<sup>[131]</sup>, Monolithe mittels Atom Transfer Radical Polymerization (ATRP) herzustellen, führte jedoch nur zu unporösen Materialien.

Kryogele besitzen bis zu 100 µm große Poren und eine Porosität von bis zu 90 %<sup>[132]</sup>. Sie eignen sich deshalb für Proben, die Partikel oder z. B. Zellen beinhalten<sup>[132–135]</sup>. Die Technik wurde von MATTIASSON et al. entwickelt. Die wässrige Polymerisationslösung wird gefroren und die Polymerisation unter -10 °C durchgeführt. Die Porenstruktur wird durch Wasserkristalle bestimmt, die nach der Polymerisation schmelzen und sich leicht entfernen lassen. Als Monomere werden Acrylamid, Allylglycidylether und *N,N'*-Methylenbisacrylamid mit Tetramethylethyldiamin und Ammoniumpersulfat als Initiatoren polymerisiert<sup>[136]</sup>.

Es sind auch agarosebasierte Monolithe mit 20-200 µm großen Poren bekannt. Sie sind über einen breiten pH-Wertbereich einsetzbar, weisen geringe unspezifische Bindungen aber auch eine geringe mechanische Stabilität auf. Sie werden in einer Agaroseemulsion hergestellt, die aus einer Agarosesuspension bei 95-100 °C mit Cyclohexan und Tween® 80 hergestellt, bei 60 °C temperiert und später auf 20 °C abgekühlt wird<sup>[136]</sup>.

Neueste Entwicklungen konzentrieren sich auf das Einbauen von Nanopartikeln aufgrund ihrer großen Oberfläche<sup>[137]</sup> und auf die Herstellung von Hybridmaterialien<sup>[138–141]</sup>, die die einfache Herstellung, die hohe Oberfläche und die gute mechanische und pH-Stabilität ihrer beiden Komponenten kombinieren. Nanopartikel können nach der Polymerisation auf der Monolithoberfläche gebunden<sup>[142,143]</sup> oder direkt einpolymerisiert<sup>[144]</sup> werden, wobei sie dann aber eventuell nicht mehr zugänglich sind<sup>[145]</sup>.

## 2.2 Epoxidbasierte Monolithe

Epoxidbasierte Monolithe werden, wie in diesem Abschnitt beschrieben, mit unterschiedlichen Techniken und Monomeren hergestellt. Die in dieser Arbeit synthetisierten Monolithe wurden durch Autopolymerisation von Epoxidgruppen polyfunktioneller Glycidylethern hergestellt. Im Folgenden werden deshalb Synthesewege und anderweitige Anwendungen von Glycidylethern vorgestellt sowie der Fokus auf die Bestimmung des Epoxidgehalts und den Mechanismus der Autopolymerisation von Epoxiden gelegt. Daneben werden aber zu Beginn auch Synthesewege für Epoxide angeführt und ihre Reaktivität im Allgemeinen thematisiert.

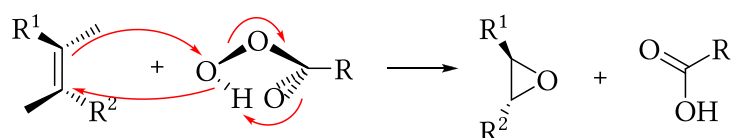
### 2.2.1 Synthese und Reaktivität von Epoxiden

Epoxide bestehen aus einem dreigliedrigen Ring, in dem zwei Kohlenstoffatome mit einem Sauerstoffatom verbunden sind. Sie sind die einfachsten zyklischen Ether und werden oft auch als Oxirane bezeichnet<sup>[146]</sup>. Ethylenoxid ist mit vier Wasserstoffsubstituenten an den beiden Kohlenstoffatomen das einfachste Epoxid, von dem sich alle Derivate ableiten<sup>[147]</sup>. Es wurde 1859 erstmals von WÜRTZ<sup>[148]</sup> durch Reaktion von 2-Chlorethanol mit Alkalihydroxid hergestellt.

In der Literatur sind zahlreiche Synthesewege für Epoxide beschrieben. Sie können sowohl direkt durch Addition von molekularem Sauerstoff als auch indirekt durch Addition eines elektrophilen Sauerstoffatoms, gebunden in Percarbonsäuren<sup>[149]</sup>, Hydroperoxiden, Wasserstoffperoxid oder Dioxiranen, an die entsprechend ungesättigte Verbindung gewonnen werden. Ethylenoxid wird großtechnisch durch Umsetzung von Ethylen mit molekularem Sauerstoff unter erhöhter Temperatur, erhöhtem Druck und durch Silberkontakt hergestellt<sup>[150]</sup>. Höhere Olefine würden allerdings in allylischer Position oxidiert werden<sup>[151]</sup>. Die Epoxidierung mit Dimethyldioxiran erfolgt durch Einsatz eines optisch aktiven Mangan(III)-salzes enantioselektiv<sup>[151]</sup>. Als Hydroperoxid wird üblicherweise *tert*-Butylhydroperoxid eingesetzt, das vor allem in Gegenwart von Molybdän- und Vanadiumverbindungen als Katalysatoren reagiert<sup>[150]</sup>. Als PRILEZHAEV- bzw. auch

als PRILESCHAJEW-Reaktion<sup>[152–154], [155–157] zitiert in [149]</sup> ist die stereospezifische aber nicht enantioselektive Epoxidierung von Olefinen durch *syn*-Addition der Percarbonsäure unter milden Bedingungen bekannt.

Die Addition ist gegenüber sterischer Hinderung von Substituenten unempfindlich und erfolgt konzertiert über einen in Abbildung 2.3 veranschaulichten Spiro-Übergangszustand, in dem vier Elektronenpaare gleichzeitig verschoben werden und die Achse der Doppelbindung zur Ebene der Percarbonsäure um 90° verschoben ist<sup>[158]</sup>.



**Abbildung 2.3.** Stereospezifische Epoxidierung durch *syn*-Addition einer Percarbonsäure an eine ungesättigte Verbindung über einen Spiro-Übergangszustand.

Hydroxylgruppen lenken den elektrophilen Angriff durch Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen im Übergangszustand auf die Seite der Hydroxylgruppen<sup>[151]</sup>. Die Reaktionsgeschwindigkeit wird durch Substituenten mit positivem induktivem Effekt am Olefin bzw. durch Substituenten mit negativem induktivem Effekt an der Percarbonsäure beschleunigt<sup>[151]</sup>. Als Säure wird in der Regel *m*-Chlorperbenzoesäure (MCPBA) eingesetzt<sup>[150]</sup>. In Anwesenheit von Carbonylverbindungen wird allerdings Imidopersäure eingesetzt, die selektiv die Kohlenstoff-Kohlenstoffdoppelbindung oxidiert und keine BAEYER-VILLIGER-Oxidation mit der Carbonylgruppe eingeht<sup>[158]</sup>. Die Polarität des Lösungsmittels hat auf die Reaktionsgeschwindigkeit keinen Einfluss. Um eine anschließende Hydrolyse der Epoxide zu vermeiden, wird die Reaktion aber in indifferenten Lösungsmitteln durchgeführt<sup>[150]</sup>. In der Regel werden chlorierte Kohlenwasserstoffe eingesetzt, da protische Lösungsmittel zudem die Ausbildung der intramolekularen Wasserstoffbrückenbindungen unterdrücken können<sup>[151]</sup>. Der Nachteil der beschriebenen Reaktionen ist jedoch die teilweise starke Explosionsgefahr der Reaktanden. Alternativ können Epoxide durch Addition hypohalogeniger Säuren an Olefine hergestellt werden. Das gebildete Halohydrin wird basisch intramolekular zum Epoxid dehydrohalogeniert<sup>[158]</sup>. Epichlorhydrin, das z. B. ein Zwischenprodukt in der Glycerolherstellung<sup>[151]</sup> und wichtiges Edukt in der Glycidestersynthese ist, wird auf diese Weise hergestellt.

Enantiomerenreine Epoxide sind für die Herstellung von Antibiotika interessant<sup>[150]</sup>. Bedeutend sind vor allem die Epoxidierungen nach SHARPLESS<sup>[159–162]</sup>, für die er 2001 den Nobelpreis erhielt<sup>[163]</sup> und nach JAKOBSEN<sup>[164,165]</sup>. Beide Reaktionen gehören zur Klasse der katalytisch asymmetrischen Synthesen, bei denen die Stereoselektivität durch ein in katalytischen Mengen eingesetztes chirales Additiv kontrolliert wird (Additivkontrol-

le)<sup>[158]</sup>. Bei der Epoxidierung nach SHARPLESS werden primäre und sekundäre Allylkohole mit *tert*-Butylhydroperoxid als Oxidationsmittel und (*R,R*)- oder (*S,S*)-Weinsäurediethylester als prochirales Additiv an Titan(IV)-isopropylat koordinativ gebunden<sup>[166]</sup>. Dabei werden achirale Allylkohole enantioselektiv, chirale primäre Allylkohole diastereoselektiv epoxidiert und racemische sekundäre Allylkohole können durch Racematspaltung voneinander getrennt werden<sup>[158]</sup>. Bei der Epoxidierung nach JAKOBSEN werden (*Z*)-Alkene, die keine funktionelle Gruppe tragen müssen, mit Natriumhypochlorit als Oxidationsmittel und einem chiralen Mangan(III)-Salen-Komplex umgesetzt. Die Epoxidierung nach SHI<sup>[167,168]</sup> ist eine weitere Reaktion zur Herstellung asymmetrischer Epoxide, bei der Olefine mit Oxon als Oxidationsmittel und anstelle eines metallbasierten Katalysators mit einem von der Fructose abgeleiteten Organokatalysator umgesetzt werden. Diastereoselektive Epoxide lassen sich unabhängig von der Ausgangskonfiguration durch Reaktion eines Schwefelylids mit einer Carbonylverbindung herstellen. Dieser Syntheseweg wurde von JOHNSON ent- und von COREY und CHAYKOVSKY weiterentwickelt<sup>[169,170]</sup>. Die Reaktion nach DARZENS und CLAISEN<sup>[171–173]</sup> ist eine Glycidesterkondensation<sup>[174]</sup>, bei der eine Carbonylverbindung mit einem  $\alpha$ -Halogenester im Basischen über ein Halohydrin zu einem  $\alpha,\beta$ -Epoxidester reagiert.

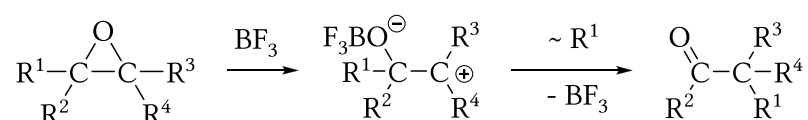
Epoxidierungen finden auch enzymatisch, durch Oxygenasen katalysiert, in Organismen statt. Ein bekanntes Beispiel ist die Epoxidierung von Benzo[*a*]pyren durch die Hämproteine der Cytochrom-P-450-Gruppe. Das gebildete Epoxid wird enzymatisch zum *trans*-Diol geöffnet und zum isomeren und hoch reaktiven Benzo[*a*]pyren-7,8-dihydroxy-9,10-epoxid metabolisiert, das z. B. mit in Ribonukleinsäure (RNS) oder DNS gebundenem nukleophilen Stickstoff reagieren kann und deshalb kanzerogen wirkt<sup>[175]</sup>.

Epoxide sind aufgrund ihrer Ringspannung reaktive Verbindungen, die sauer oder basisch katalysiert durch Nukleophile geöffnet werden können, wobei terminale Epoxide in der Regel reaktiver sind<sup>[147]</sup>. Im basischen Milieu greift das Nukleophil den nicht aktivierten Ring auf der dem Sauerstoff gegenüberliegenden Seite an. Die Reaktion folgt dem  $S_N2$ -Mechanismus, nach dem am Reaktionszentrum eine Inversion der Konfiguration eintritt. Der Angriff erfolgt aus sterischen Gründen regioselektiv am weniger substituierten Kohlenstoffatom. Als Nukleophile können z. B. Alkoholate, Thiolate, Ammoniak oder anorganische Basen eingesetzt werden<sup>[147]</sup>.

Mit Säuren nach BRØNSTED werden die Epoxide durch Protonierung des Sauerstoffatoms aktiviert. In verdünnten Säuren fungiert Wasser als Nukleophil und es entsteht ein vicinales Diol. Mechanistisch ist jedoch nicht geklärt, ob es sich um eine  $S_N2$ - oder um eine  $S_N1$ -Reaktion handelt, bei der ein Carbeniumion als Zwischenstufe gebildet würde. Der Angriff erfolgt bevorzugt am stärker substituierten Kohlenstoffatom, jedoch wird am Reaktionszentrum auch eine Inversion der Konfiguration beobachtet. PARKER et al.<sup>[147]</sup>

stellen in ihrem Review eine ausführliche Liste von substituierten Epoxiden und ihren Produkten nach einem nukleophilen Angriff zusammen. Sie kategorisieren dabei die Liganden nach ihrem sterischen, induktiven und mesomeren Einfluss auf die Regioselektivität des Angriffs.

In Gegenwart von LEWIS-Säuren können Epoxide in einer Semipinakol-Umlagerung, wie in Abbildung 2.4 veranschaulicht, durch [1,2]-Wanderung eines Substituenten zur Carbonylverbindung über die Zwischenstufe eines Carbeniumions umlagern<sup>[176,177]</sup>.



**Abbildung 2.4.** Semipinakol-Umlagerung von Epoxiden zur Carbonylverbindung in Gegenwart von Bortrifluorid als Beispiel einer LEWIS-Säure.

Die Umlagerung kann auch infolge erhöhter Temperatur eintreten<sup>[147]</sup>. Bei der Umlagerung wird die Kohlenstoff-Sauerstoff-Bindung gebrochen, die die Substituenten mit dem größeren positiven induktiven Effekt trägt, wodurch das stabilere Carbeniumion gebildet wird<sup>[147]</sup>. Für die darauffolgende Umlagerung gilt als Wanderungstendenz der Substituenten bei asymmetrisch substituierten Epoxiden Aryl > Acyl > H > Ethyl > Methyl<sup>[147]</sup>. Infolge der Umlagerung kann es auch zu Ringvergrößerungen oder -verkleinerungen kommen<sup>[147]</sup>. Die Reaktion wird, um eine solvolytische Aufspaltung zu vermeiden, in unpolaren Lösungsmitteln durchgeführt<sup>[178]</sup> und kann zur Identifizierung von Olefinen durch Derivatisierung der Carbonylgruppe genutzt werden<sup>[150]</sup>.

## 2.2.2 Typen epoxidbasierter Monolithe

Epoxidbasierte Monolithe zeichnen sich als Trägermaterial besonders wegen ihrer guten Funktionalisierbarkeit mit dem nukleophilen Liganden der Wahl aus. Auf dem Gebiet der epoxidhaltigen Monolithe dominiert das in einer Radikalkettenpolymerisation (ca. 70 °C, ca. 6 h) hergestellte Copolymer Poly(GMA-*co*-EDMA)<sup>[179,180]</sup>. Die Epoxidgruppe wird durch den Glycidylrest in das Polymer eingebaut. GMA/EDMA-Monolithe werden als feste Phase sowohl in der Ionenaustauschchromatographie, Umkehrphasenchromatographie, Affinitätschromatographie als auch in der Festphasenpeptidsynthese eingesetzt<sup>[9,181–184]</sup>.

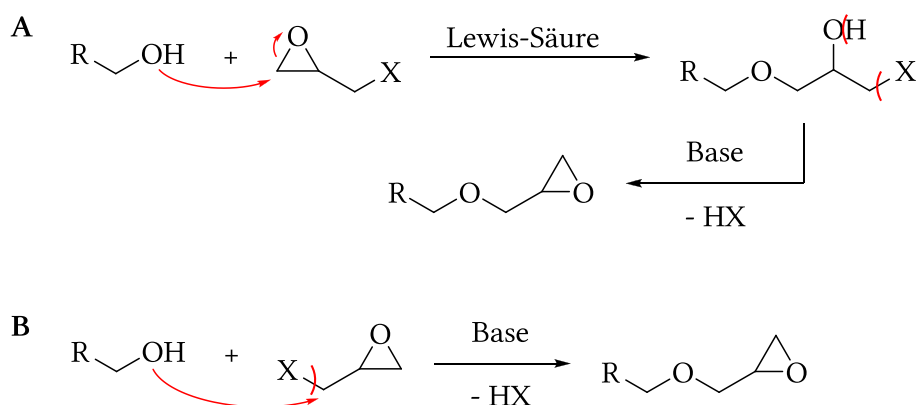
Daneben entwickelte die Gruppe um Hosoya<sup>[44,185–190]</sup> eine Polykondensationspolymerisation, in der sie zunächst Tris(2,3-epoxypropyl)isocyanurat (TEPIC) als trifunktionelles Epoxidmonomer mit 4-[(4-Aminocyclohexyl)methyl]cyclohexan (BACM) (65; 70 und 75 °C, 24 h<sup>[191]</sup> bzw. bei 80 °C, 12 h<sup>[192]</sup>) vernetzten. Im Gegensatz zu GMA/EDMA-



Monolithen wird hierbei die Epoxidgruppe als funktionelle Gruppe auch in der Polymerisation genutzt. Die Synthese wurde durch Austausch von TEPIC durch das tetrafunktionelle Epoxidmonomer 1,3-Bis(*N,N'*-diglycidylaminomethyl)cyclohexan (TETRAD-C) optimiert. Diese Monolithe schrumpften im Zuge der Polymerisation weniger stark<sup>[193]</sup>. Sie werden in der hydrophilen Interaktionschromatographie (engl. *Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography*, HILIC) und der Umkehrphasenchromatographie eingesetzt. TALEBI et al.<sup>[4]</sup> setzten als Epoxidmonomer Glycidylether 100 (GE 100) und Ethylendiamin als Aminokomponente ein (70-120 °C, ca. 20 h). Die hergestellten Monolithe verwendeten sie für die Separation von Proteinen und kleineren Molekülen in der HILIC. IRGUM et al. publizierten die Herstellung epoxidbasierter Monolithe durch Emulsionspolymerisation. Dabei befindet sich das Amin in einer wässrigen Phase, in die das Epoxidmonomer dispergiert wird. Die Polymerisation wird thermisch initiiert. Als Monomere wurden 1,4-Butandiol diglycidylether (BDG) und Bisphenol-A-diglycidylether (BADGE) eingesetzt<sup>[194]</sup>. Die Säulen wurden zur Proteintrennung genutzt. In weiteren Arbeiten beschrieben sie Synthesen mit Tetraethylenpentamin und 1,6-Diaminohexan als Aminokomponenten<sup>[195]</sup> und Glyceroltriglycidylether als zusätzlicher Epoxidkomponente, der strukturell dem von TALEBI et al. eingesetzten GE 100 entspricht. TU et al.<sup>[196]</sup> unterbrachen die Polymerisation zwischen einem Glycidylether (Bezeichnung AFG90, Shanghai Institute of Resin, China) und einem Polyamidharz und quollen den Monolith in der Initiatorlösung auf. Danach beendeten sie die Polymerisation und konnten den Monolith anschließend mit Polyacrylsäure hydrophil beschichten. WELLER et al.<sup>[11]</sup> führten die Autopolymerisation von polyfunktionellen Glycidylethern ein. Das monolithische Netzwerk entsteht durch die LEWIS-Säure-katalysierte Autopolymerisation der Epoxidgruppen bei Raumtemperatur in wenigen Stunden. Die nicht polymerisierten Epoxidgruppen nutzten sie zur weiteren Funktionalisierung der Monolithe. Sie wurden unter anderem für die Anreicherung von Bakterien angewendet<sup>[12,13]</sup>.

### 2.2.3 Glycidylether - Synthesestrategien und Verwendung

Während monofunktionelle Glycidylether als Reaktivverdünner in Epoxidharzen oder als Stabilisatoren für halogenierte Lösungsmittel verwendet werden, finden polyfunktionelle Glycidylether als Haftvermittler für Fasern, in der Papierindustrie und als Härungskomponente für Epoxidharze Verwendung<sup>[197]</sup>. Polyesterharze mit z. B. TEPIC als trifunktioneller Vernetzer besitzen gute mechanische, elektrische und thermische Eigenschaften und zeichnen sich aufgrund des Triazin-Grundgerüsts<sup>[198]</sup> durch UV-Beständigkeit (Ultraviolettstrahlung) aus<sup>[199]</sup>. Glycidylether werden für ihre Verwendung in technischer Reinheit hergestellt und eingesetzt. Neben der industriellen Bedeutung sind sie

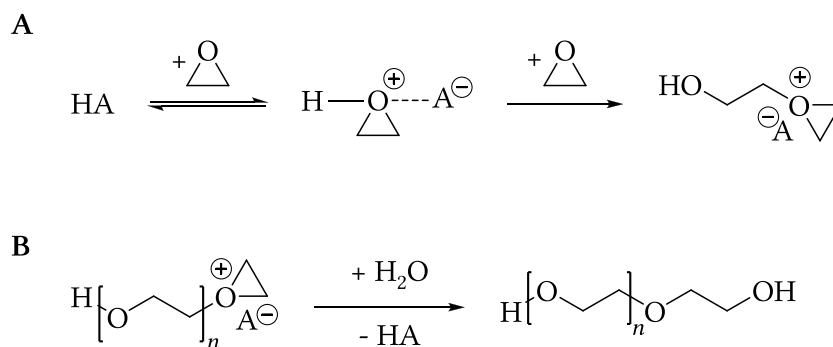


**Abbildung 2.5.** Synthesewege für die Herstellung von Glycidylethern über (A) die LEWIS-Säure-katalysierte Bildung eines Halohydrins und (B) nach einer WILLIAMSONschen Ethersynthese, X = Cl, Br.

auch wichtige Ausgangssubstanzen in der Synthese<sup>[200–203]</sup> und supramolekularen Chemie<sup>[203]</sup>, wie z. B. für die Synthese von Dendrimeren<sup>[203,204]</sup>.

Polyglycidylether werden hauptsächlich auf zwei Synthesewegen hergestellt, die in Abbildung 2.5 dargestellt sind. Eine zweistufige Reaktion führt über die Bildung eines Halohydrins durch LEWIS-Säure-katalysierte Reaktion zwischen Epichlorhydrin und einem Polyalkohol mit anschließender Dehydrohalogenierung im Basischen zum Produkt (A)<sup>[205]</sup>. TEPIC wird großtechnisch durch Addition von Epichlorhydrin an Isocyanursäure hergestellt<sup>[206]</sup>. KIDA et al.<sup>[203]</sup> entwickelten indessen eine einstufige Reaktion nach einer klassischen WILLIAMSONschen Ethersynthese (B). Sie setzen einen Polyalkohol und Epichlorhydrin, gelöst in Dimethylsulfoxid (DMSO), mit Kaliumhydroxid als Feststoff um. Für eine hohe Ausbeute war es wichtig, dass beide Komponenten, Epichlorhydrin und der Polyalkohol, in einer Phase gelöst vorliegen.

Für monofunktionelle langkettige Glycidylether sind Zweiphasenreaktionen beschrieben, bei denen Epichlorhydrin und ein Alkohol, gelöst in einer organischen Phase, mit wässriger Natriumhydroxidlösung mittels eines Phasentransferkatalysators umgesetzt werden<sup>[207]</sup>. NAJEM et al.<sup>[208]</sup> fanden in ihren Studien heraus, dass für die Synthese monofunktionaler Glycidylether mit einer Kohlenstoffkettenlänge länger als 14 Kohlenstoffatomen Epibromhydrin anstelle von Epichlorhydrin zu höheren Ausbeuten führte. KANG et al.<sup>[209]</sup> vereinfachten die Synthese, indem sie am Beispiel von Octanol und Octadecanol zeigten, dass die Synthese ohne organische und wässrige Lösungsmittel gelingt. Sie setzten den Alkohol direkt mit Epichlorhydrin, festem Natriumhydroxid in Gegenwart eines Phasentransferkatalysators um.



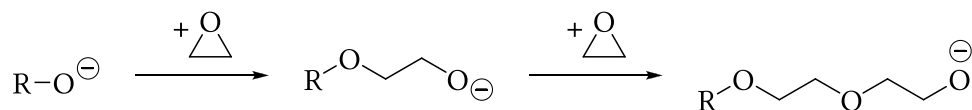
**Abbildung 2.6.** (A) Mechanismus der kationischen Autopolymerisation von Epoxiden am Beispiel von Ethylenoxid, (B) Abbruchreaktion durch Reaktion mit Wasser<sup>[211]</sup>.

### 2.2.4 Mechanismen der Autopolymerisation von Epoxiden

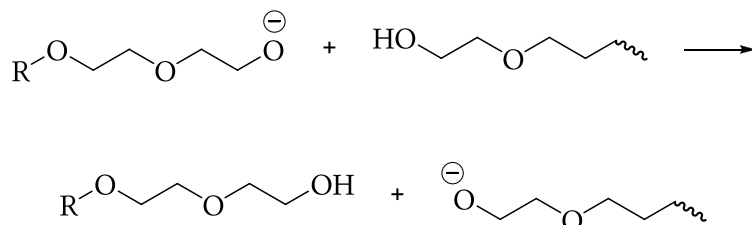
Epoxide können anionisch, kationisch oder koordinativ eine Autopolymerisation bzw. Homopolymerisation eingehen<sup>[210,211]</sup> und unterscheiden sich damit von anderen zyklischen Ethern, die nur unter Verwendung starker kationischer Initiatoren polymerisieren<sup>[211]</sup>. Daneben polymerisiert z. B. Ethylenoxid auch in Anwesenheit von metallischem Natrium oder Kalium explosionsartig zu Polymeren mit Molgewichten zwischen 160-10 000 g mol<sup>-1</sup><sup>[210]</sup>. Als Produkte entstehen Polyether in Form von viskosen Flüssigkeiten oder Feststoffen, im Fall von bi- oder höher funktionellen Epoxidmonomeren bilden sich Polymernetzwerke aus. Sie haben eine große industrielle Bedeutung und finden unter anderem als Haftvermittler, Dichtungsmasse, für Elektroisolierungen und in Lacken Verwendung<sup>[210,212]</sup>. Schon 1950 wurde z. B. die Autopolymerisation von Butyloxid mit Bortrifluorid-Etherat patentiert<sup>[213]</sup>.

Die kationische Polymerisation kann sowohl durch LEWIS-Säuren wie z. B. Bortrifluorid und Zinntetrachlorid als auch durch BRØNSTED-Säuren initiiert werden. Für Bortrifluoridkomplexe gilt, je stärker die LEWIS-Basizität der komplexierenden Komponente ist, desto unreaktiver ist der Komplex. Der Etheratkomplex führt häufig aufgrund seiner hohen Reaktivität zu heftigen Reaktionen. Aus diesem Grund werden Bortrifluoridaminkomplexe wie Monoethylamin<sup>[214-217]</sup> oder 4-Methoxyanilin<sup>[218]</sup> eingesetzt. RYAN et al.<sup>[212]</sup> tauschten Diethylether gegen ein Triol aus und BEDNAREK et al.<sup>[219]</sup> setzten Tetrafluoroborsäure-Etherat ein. Der Mechanismus der BRØNSTED-Säuren-katalysierten Polymerisation verläuft über die Bildung von Oxoniumionen, wie in Abbildung 2.6 (A) gezeigt. Es entstehen in der Regel niedermolekulare Polymere, da die Gegenwart von Wasser zum Abbruch führen kann (B)<sup>[211]</sup>. Der Mechanismus der LEWIS-Säure-katalysierten Reaktion kann dagegen komplex sein und hängt von der jeweiligen LEWIS-Säure ab. Alkylsubstituenten begünstigen dabei die Bildung höhermolekularer Polymere.

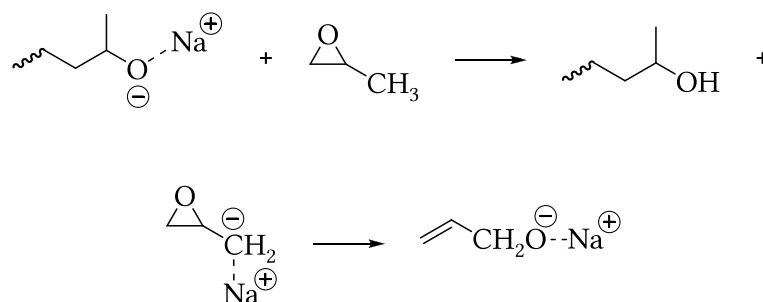
C



D



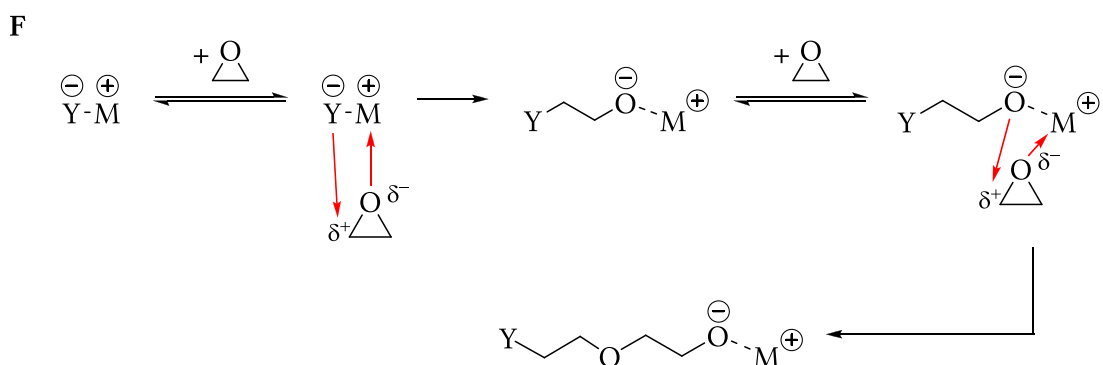
E



**Abbildung 2.7.** (C) Mechanismus der anionischen Autopolymerisation von Epoxiden am Beispiel von Ethylenoxid, (D) Protonenübertrag, (E) Eliminierungsreaktion nach Typ 2 am Beispiel von Propylenoxid<sup>[211]</sup>.

Die anionische Polymerisation wird durch Alkalihydroxide oder Alkoholate durch eine  $S_N2$ -Reaktion initiiert. Dabei wird, wie in Abbildung 2.7 (C) dargestellt, ein Alkoholat generiert, das nukleophil an ein weiteres Epoxid addiert, usw. In Gegenwart von z. B. Alkoholen kann ein Protonenübertrag das Kettenwachstum abbrechen, gleichzeitig aber zu einem neuen reaktiven Zentrum führen (D). Es handelt sich daher um eine lebende Polymerisation, die nach weiterer Monomerzugabe fortgesetzt werden kann<sup>[211]</sup>. Bei substituierten Epoxiden kann es zu Eliminierungsreaktionen nach Typ 2 kommen (E), die die Bildung von niedermolekularen Polymeren zur Folge haben<sup>[211]</sup>.

Für die Autopolymerisation nach dem koordinativen Mechanismus sind verschiedene Katalysatoren einsetzbar, wie z. B. ZIEGLER-NATTA-Katalysatoren oder Erdalkalimetallverbindungen (Calciumamide). Der Mechanismus ist im Detail noch nicht vollständig aufgeklärt. Angenommen wird die Koordination des Monomers an elektrophile Zentren des Katalysators, wie in Abbildung 2.8 (F) veranschaulicht. Die Polymerisation führt zu hochmolekularen Polymeren<sup>[211]</sup>.



**Abbildung 2.8. (F)** Mechanismus der koordinativen Autopolymerisation von Epoxiden am Beispiel von Ethylenoxid, M = Metall<sup>[211]</sup>.

### 2.2.5 Methoden zur Bestimmung des Epoxidgehalts

Der Epoxidgehalt einer Verbindung kann entweder durch den prozentualen Anteil des im Epoxid gebundenen Sauerstoffs oder durch das Epoxidäquivalentgewicht (engl. *Epoxy Equivalent Weight*, EEW) angegeben werden. Das EEW entspricht der Menge an Epoxid in Gramm, die 1 mol Epoxide enthält. Daneben ist auch der Epoxidwert (engl. *Epoxy Number*, EN) geläufig, der der Stoffmenge in Mol an Epoxid entspricht, die in 100 Gramm der Epoxidverbindung enthalten ist. Zwischen den beiden Angaben gilt folgender Zusammenhang<sup>[220]</sup>:

$$\text{Epoxidwert} = \frac{100}{\text{Epoxidäquivalentgewicht}}. \quad (2.3)$$

Die Struktur des Epoxids wurde, wie bereits erwähnt, im Jahr 1859<sup>[221]</sup> erstmals beschrieben, doch erst ca. 70 Jahre später wurde eine Methode<sup>[222]</sup> zur quantitativen Bestimmung beschrieben, in der Epoxide mit wasserfreier Salzsäure in Diethylether umgesetzt wurden. DOBINSON et al.<sup>[223]</sup> verfassten einen ausführlichen Überblick über unterschiedliche Epoxidbestimmungsmethoden mit ihren Vor- und Nachteilen.

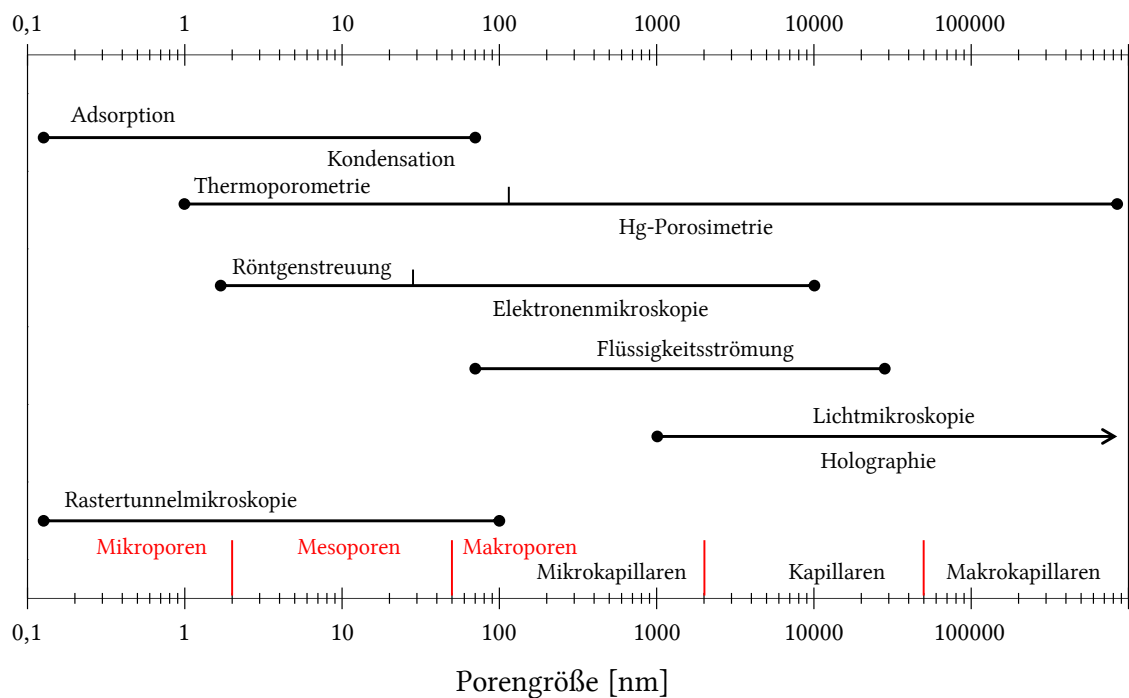
Die Hydrohalogenierung im Wässrigen mit Salz- oder Bromwasserstoffsäure und anschließender Rücktitration des Überschusses ist immer noch weit verbreitet. Nachteilig kann eine stattfindende Hydrolyse sein, wodurch ein zu niedriger Epoxidgehalt bestimmt würde. Außerdem kann es infolge der sauren Katalyse zu Umlagerungsreaktionen kommen, die vor allem Epoxide eingehen, die ein stabiles Carbeniumion ausbilden können (vgl. Abschnitt 2.2.1 auf Seite 15). Darüber hinaus kann es beispielsweise mit Hydroxylgruppen zu intramolekularen Nebenreaktionen kommen, die durch Verwendung der reaktiveren Bromwasserstoffsäure anstelle von Salzsäure supprimiert werden sollen.

Anstelle der Rücktitration überschüssiger Halogenwasserstoffsäure hat sich die von DURBETAKI<sup>[224]</sup> entwickelte direkte Titration etabliert. Hierbei wird Bromwasserstoffsäure durch Titration von Tetraethyl- oder Tetramethylammoniumbromid mit Perchlorsäure *in situ* erzeugt<sup>[225–228]</sup>. Sie ist sowohl für die Titration terminaler als auch der weniger reaktiven nicht terminalen Epoxide geeignet, erfordert aber wegen des Einsatzes von Perchlorsäure besondere Sicherheitsmaßnahmen.

Nukleophile wie Thiosulfate, Iodide, Sulfite<sup>[229]</sup> und Amine reagieren mit reaktiveren Epoxiden, wobei Substituenten mit einem negativen induktiven Effekt die Reaktionsgeschwindigkeit erhöhen. Die freigesetzten Äquivalente an Natronlauge werden durch Titration mit Salzsäure quantifiziert. Liegen als Verunreinigung weitere Säure konsumierende Gruppen vor, kommt es infolge eines erhöhten Säureverbrauchs zu einer Überbestimmung des Epoxidgehalts. Die Interferenz kann durch einen Indikator vermieden werden, der vor der Protonierung der Verunreinigung, die eine schwächere Base als Natronlauge sein muss, umschlägt. Dafür muss die Lösung auf den pH-Wert des Umschlagspunktes zu Beginn der Titration eingestellt werden. Analoges gilt für die oben beschriebene Hydrohalogenierung, bei der zusätzlich vorliegende Base verbrauchende Gruppen zu einer Unterbestimmung des Epoxidgehalts führen können.

### 2.3 Methoden zur Charakterisierung von Monolithen

Monolithe werden hinsichtlich ihrer Porengrößenverteilung, Porosität und spezifischen Oberfläche charakterisiert, die ihre Permeabilität und Kapazität beeinflussen. Zur Bestimmung poröser Eigenschaften gibt es zahlreiche analytische Methoden, die auf unterschiedlichen physikalischen Prinzipien beruhen<sup>[231]</sup> und unterschiedliche Porengrößenbereiche erfassen. In Abbildung 2.9 ist eine Auswahl gängiger Methoden und ihrer Messbereiche zusammengestellt. Für Porosimetrieuntersuchungen von Monolithen im trockenen Zustand sind vor allem die Gasadsorption und Quecksilber-Intrusionsporosimetrie<sup>[232]</sup> die Methoden der Wahl, die sich zudem in ihren Messbereichen ergänzen. Mikroskopische Techniken werden für die Bestimmung der Porengröße indessen zunehmend populärer, während Methoden wie die Thermoporometrie, Röntgen- oder Kleinwinkelstreuung bisher hingegen kaum bzw. gar nicht eingesetzt werden. Um monolithische stationäre Phasen unter realen chromatographischen Bedingungen zu analysieren, eignet sich die inverse Gel-Permeationschromatographie (engl. Inverse Size Exclusion Chromatography, ISEC). Hierbei handelt es sich im Gegensatz beispielsweise zur Quecksilber-Intrusionsporosimetrie oder zu einigen mikroskopischen Techniken um eine zerstörungsfreie Methode.



**Abbildung 2.9.** Messbereiche ausgewählter Methoden zur Porengrößenbestimmung<sup>[230]</sup>.

Im Folgenden wird sie ergänzend zur Gasadsorption und Quecksilber-Intrusionsporosimetrie detaillierter erläutert und es werden die Vor- und Nachteile der drei Methoden diskutiert. Außerdem wird die Funktionsweise eines Environmental Scanning Electron Microscope (ESEM) beschrieben, das zur Visualisierung der Morphologie der Monolithe verwendet wurde. Zusätzlich wurden die Monolithe in der vorliegenden Arbeit durch Messung ihrer Härte nach SHORE charakterisiert, deren Prinzip ebenfalls erklärt wird. Schließlich werden Methoden genannt, mit denen sich die auf dem Monolith immobilisierte Proteinmenge bzw. seine Kapazität im Allgemeinen bestimmen lassen.

### 2.3.1 Quecksilber-Intrusionsporosimetrie

Die Quecksilber-Intrusionsporosimetrie<sup>[230]</sup> ist eine Routinemethode zur Bestimmung der Porengrößenverteilung, der Porosität, des Gesamtporenvolumens sowie der Dichte und spezifischen Oberfläche einer porösen Probe. Sie beruht auf der Messung des in Poren intrudierten Quecksilbervolumens als Funktion eines von außen angelegten Drucks<sup>[231,233,234]</sup>.

WASHBURN<sup>[235,236]</sup> beschrieb 1921 als Erster, dass der Kontaktwinkel  $\vartheta$  einer Flüssigkeit größer als  $90^\circ$  sein muss, damit ihre Oberflächenspannung  $\sigma$  einer Intrusion in Poren ohne äußere Druckeinwirkung entgegenwirkt und formulierte die unter seinem Na-

men bekannte WASHBURN-Gleichung (Gleichung 2.4) zur Transformation des angelegten Drucks  $p$  in den entsprechenden Porenradius  $r_p$ . Der Druck verhält sich dabei umgekehrt proportional zum Porenradius:

$$r_p = -\frac{2\sigma \cdot \cos\vartheta}{p}. \quad (2.4)$$

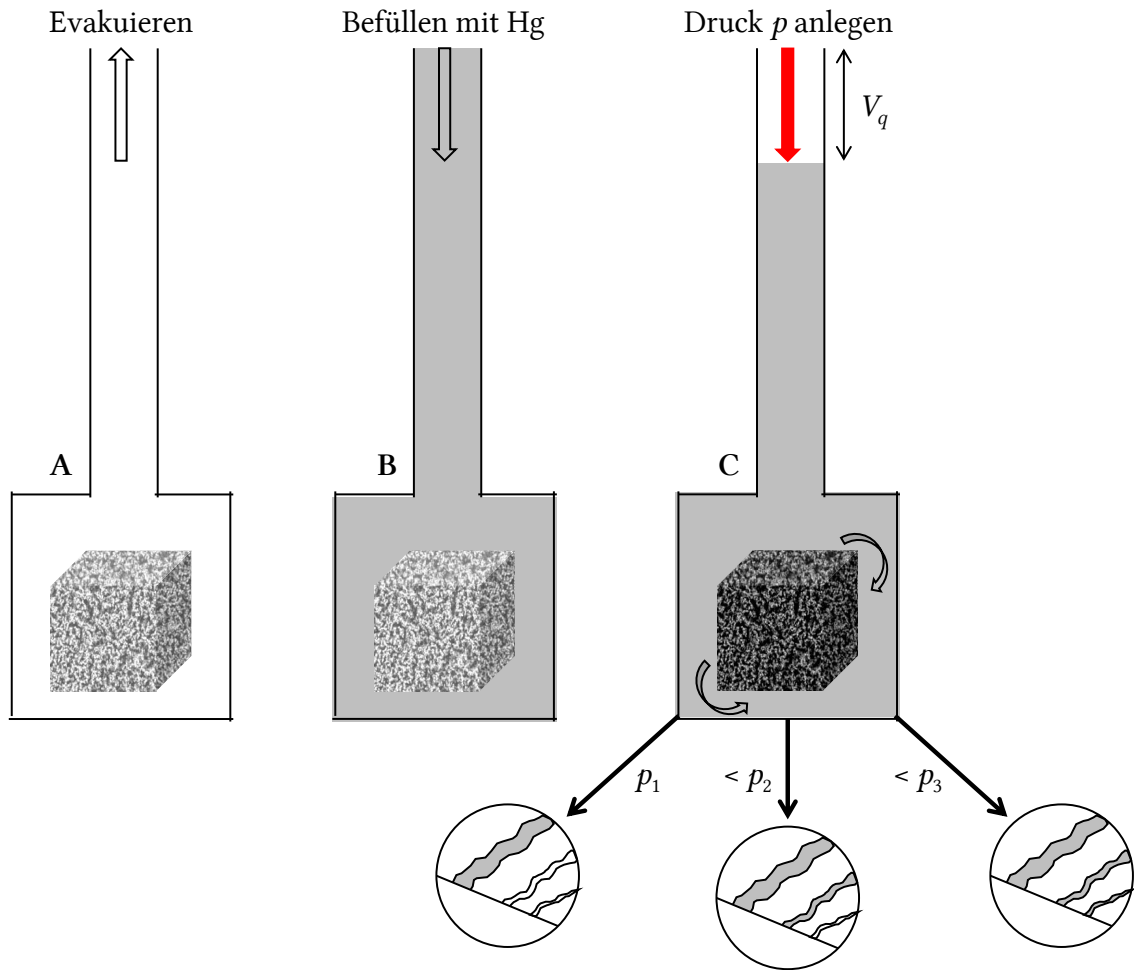
Quecksilber erfüllt mit einem vom Feststoff abhängigen aber in der Regel mit ca.  $140^\circ$  angenommenen Kontaktwinkel und einer Oberflächenspannung von  $0,484 \text{ N m}^{-1}$  bei  $25^\circ\text{C}$  diese Bedingung<sup>[233,237]</sup>. Als alternative Flüssigkeiten mit einem niedrigen Schmelzpunkt sind Gallium, Indium und ihre Legierungen denkbar. Sie benetzen allerdings viele Oxide und dringen in das kristalline Netzwerk vieler Metalle ein. Unter anderem wurde auch Wasser zur Messung hydrophober Materialien eingesetzt<sup>[238,239]</sup>. Viele Verbindungen weisen aber mit  $< 90^\circ$  einen zu kleinen Kontaktwinkel auf und sind somit für die Messung nicht ausreichend hydrophob<sup>[237]</sup>. Quecksilber ist insoweit die für dieses Verfahren einzige universell geeignete nicht benetzende Flüssigkeit<sup>[234]</sup>.

Im Jahr 1945 publizierten RITTER und DRAKE ihre Arbeiten<sup>[240,241]</sup> zur Entwicklung des heute bekannten und auf Quecksilber basierenden Verfahrens. Der Ablauf einer solchen Messung ist in Abbildung 2.10 schematisch dargestellt. Die trockene und nicht amalgambildende Probe wird, um Luft aus den Poren zu entfernen, in einem Penetrometer evakuiert (A). Anschließend wird die Kammer mit Quecksilber befüllt (B), der Druck sukzessive erhöht und das abnehmende Quecksilbervolumen als Funktion des Drucks registriert (C). Aus der aufgenommenen Quecksilber-Intrusionskurve wird durch Transformation des Drucks in den Porenradius nach WASHBURN (Gleichung 2.4) die kumulative Porenvolumenverteilung erstellt und durch ihre einfache Ableitung die differentielle Porenvolumenverteilung erhalten<sup>[233]</sup>.

Der Druckbereich reicht bis  $400 \text{ MPa}$ , sodass Porenweiten im Bereich von ca.  $4 \text{ nm}$ – $400 \mu\text{m}$  erfasst werden können<sup>[243]</sup>. Dabei müssen aber eine mögliche Kompression der Probe und des Quecksilbers sowie thermische Einflüsse berücksichtigt werden<sup>[243]</sup>. Der Auswertung liegen zylinderförmige Poren als Porenmodell zu Grunde, wobei sie vielmehr in Form von Rissen, Spalten oder anderweitig irregulär geformten Zwischenräumen vorliegen<sup>[234,244]</sup>. Bei Erniedrigung des Drucks zieht sich das Quecksilber aus den Poren wieder zurück und die erhaltene Hystereseform lässt gewisse Rückschlüsse auf die tatsächlich vorliegende Porenform zu<sup>[234,237,245]</sup>. Die Extrusion des Quecksilbers erfolgt allerdings nicht vollständig, sodass es sich bei der Quecksilber-Intrusionsporosimetrie um keine zerstörungsfreie Methode handelt.

Der Berechnung der spezifischen Oberfläche  $S_m$  nach ROOTARE und PRENZLOW<sup>[246]</sup> (Gleichung 2.7) liegt kein Porenmodell zu Grunde. Als einzige Voraussetzung dürfen keine





**Abbildung 2.10.** Schematischer Ablauf und Prinzip einer Quecksilber-Intrusionsporosimetriemessung<sup>[verändert nach [242]]</sup>.

Tintenfassporen, die wie die Form eines Tintenfasses einen engen Porenhals und einen voluminösen Porenkörper besitzen, vorliegen. Die Gleichung leitet sich aus der Arbeit  $dW$  her, die für das Eintauchen einer Fläche  $dS$  eines nicht benetzten Pulvers in Quecksilber zu leisten ist:

$$dW = \sigma \cdot \cos\vartheta \cdot dS. \quad (2.5)$$

Diese entspricht der Arbeit, die für die Intrusion des Quecksilbervolumens  $dV_q$  in die Probe unter äußerer Druckeinwirkung verrichtet wird:

$$\sigma \cdot \cos\vartheta \cdot dS = -pdV_q. \quad (2.6)$$

Das Integral zur Berechnung der spezifischen Oberfläche kann entweder numerisch oder aus der Quecksilber-Intrusionskurve graphisch gelöst werden:

$$S_m = -\frac{1}{m \cdot \sigma \cdot \cos \vartheta} \int_{V_{q,0}}^{V_{q,max}} p dV_q. \quad (2.7)$$

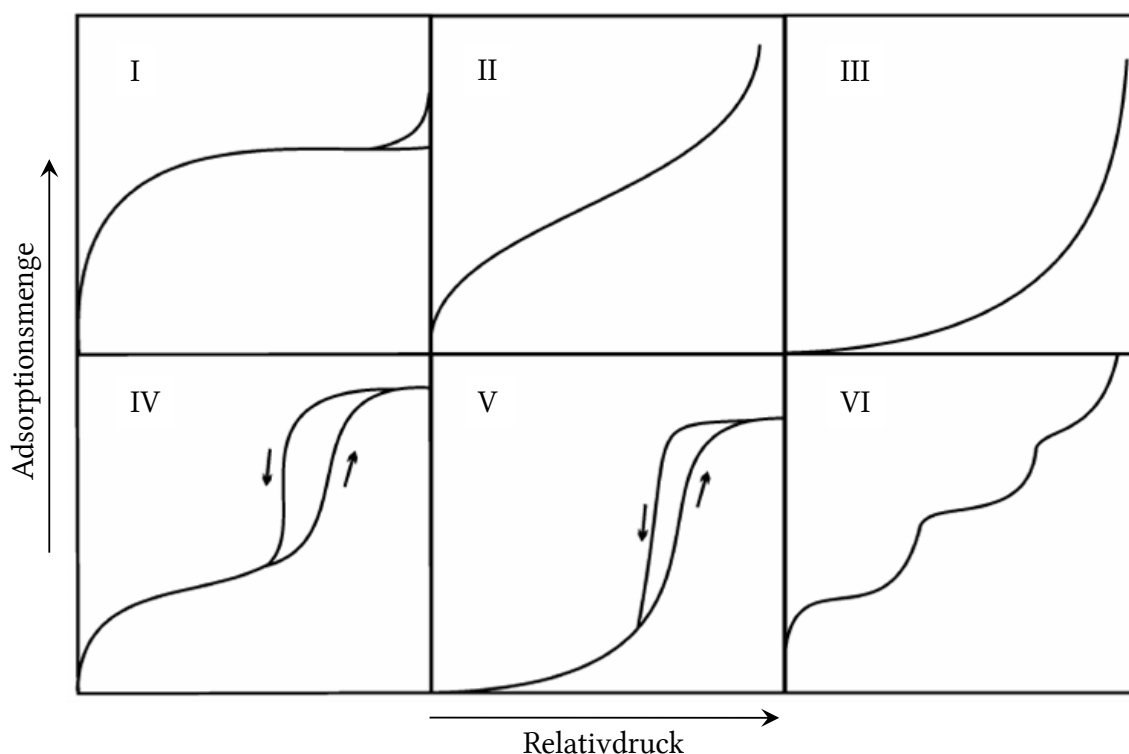
Da, wie bereits erwähnt, Poren kleiner als 4 nm nicht mehr erfasst werden, kann der Wert von dem, der mittels Gasadsorption bestimmt wurde, abweichen. Ein linearer Zusammenhang zwischen den mit beiden Methoden ermittelten spezifischen Oberflächen besteht im Bereich von  $10\text{-}100 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$  [234].

In ihrem aktuellen Übersichtsartikel zur Charakterisierung makroporöser Materialien beschreiben ROUQUEROL et al. [237] alternative Techniken zur Quecksilber einsetzenden Porosimetrie. Dazu zählt unter anderem die „Flüssigkeits-Porosimetrie“, entwickelt von MILLER und TYOMKIN [247]. Hierbei wird das Prinzip der Quecksilber-Intrusionsporosimetrie umgekehrt, indem negative Drücke zum Freisetzen von in Poren befindlicher Flüssigkeit führen, deren Volumen dem Porenvolumen entspricht, das bei gegebenem Druck die Flüssigkeit austreten lässt. Das Flüssigkeitsvolumen wird gravimetrisch bestimmt. Im Gegensatz zur Quecksilber-Intrusionsporosimetrie können benetzende Flüssigkeiten wie Wasser oder organische Lösungsmittel eingesetzt werden. Außerdem handelt es sich um eine zerstörungsfreie Methode, die Porengrößenverteilungen im Bereich von  $1\text{-}1000 \mu\text{m}$  erfasst. Für Materialien mit Poren kleiner als  $1 \mu\text{m}$  ist sie daher ungeeignet, stellt aber, vor allem für amalgambildende und deformierbare Stoffe mit entsprechend großen Poren, eine alternative Methode dar [237].

### 2.3.2 Gasadsorption

Die Gasadsorption [248] ist die Methode der Wahl, um die spezifische Oberfläche und Mikro- bzw. Mesoporengrößenverteilung poröser Stoffe zu bestimmen. Sie beruht auf der Annahme, dass ein Inertgas, das Adsorptiv, auf der Oberfläche eines Feststoffs, dem Adsorbens, durch schwache Wechselwirkungen wie z. B. van der Waals Wechselwirkungen oder Wasserstoffbrückenbindungen in einer monomolekularen Gasschicht [244] physisorbiert. Von der Physisorption ist die Chemisorption, bei der sich durch Wechselwirkungen der elektronische Zustand der Orbitale ändert, zu unterscheiden [248–250].

Als Adsorptiv wird üblicherweise Stickstoff (Flächenbedarf  $a_m = 0,162 \text{ nm}^2$ ) [251,252] bei seinem Siedepunkt von 77 K eingesetzt. Daneben werden auch Argon ( $a_m = 0,142 \text{ nm}^2$  bei 87 K) [252] und im Fall einer Oberfläche unter  $2 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$  das größere Krypton ( $a_m = 0,202 \text{ nm}^2$  bei 77 K) [252] genutzt. Da sich die verschiedenen Gasmoleküle in ihrer Größe unterscheiden, ist die minimal messbare Porengröße von dem eingesetzten Adsorptiv abhängig. Unter Verwendung von Stickstoff werden Porengrößen im Bereich von  $0,4\text{-}300 \text{ nm}$  erfasst [249].



**Abbildung 2.11.** Klassifizierung der Adsorptionsisothermen nach International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC)<sup>[253]</sup>: (**Typ I**) reversibel, mikroporöse Feststoffe mit kleiner äußeren Oberfläche, (**Typ II**) reversibel, nicht poröse bzw. makroporöse Stoffe, (**Typ III**) reversibel, polare Stoffe auf hydrophoben Oberflächen, keine identifizierbare Monolage, selten, (**Typ IV**) Hysterese, mesoporöse technische Adsorbentien, (**Typ V**) Hysterese, entspricht Typ III für poröse Stoffe, sehr selten, (**Typ VI**) Hysterese, einheitliche nicht poröse Oberflächen, schrittweise Mehrschichtadsorption, selten.

Für die Messung wird die entgaste Probe einem Gasstrom ausgesetzt und das adsorbierte Gasvolumen, als Adsorbat bezeichnet, volumetrisch oder gravimetrisch ermittelt<sup>[248]</sup>. Nach anschließender Erniedrigung des Drucks kommt es wieder zur Desorption des Gases und die resultierende Adsorptions-Desorptions-Isotherme wird für die Auswertung einer der insgesamt sechs nach IUPAC eingeteilten Isothermenklassen zugeordnet. In Abbildung 2.11 sind die sechs Klassen dargestellt und den entsprechenden Porentypen zugeordnet. Die meisten Messungen fallen in die Klassen II und IV<sup>[244]</sup>. Anders als theoretisch angenommen, physisorbieren die Gasmoleküle tatsächlich in multimolekularen Schichten. Dies berücksichtigt das Modell von BRUNAUER, EMMETT und TELLER (BET-Modell)<sup>[254]</sup>, der Erweiterung der von einer monomolekularen Schicht ausgehenden LANGMUIR-Theorie<sup>[255]</sup>, für die Berechnung der spezifischen Oberfläche<sup>[231]</sup>. Die Adsorptionsisothermengleichung lautet<sup>[231]</sup>:

$$\frac{p}{V_a \cdot (p_0 - p)} = \frac{1}{V_M \cdot C} + \frac{C - 1}{V_M \cdot C} \cdot \frac{p}{p_0}, \quad (2.8)$$

wobei  $V_a$  dem Volumen des Adsorbats und  $V_M$  dem Volumen der adsorbierten monomolekularen Schicht entspricht.  $C$  ist eine dimensionslose Konstante, die von der Adsorptionsenergie<sup>[231]</sup> bzw. der Isothermenform<sup>[249]</sup> abhängig ist,  $p$  ist der Druck und  $p_0$  der Sättigungsdampfdruck des Adsorptivs. Durch Auftragen des Terms  $p/V_a \cdot (p_0 - p)$  gegen den Relativdruck  $p/p_0$  ergibt sich für den Bereich  $0,05 < p/p_0 < 0,30$  ein linearer Zusammenhang<sup>[256]</sup>, aus dem sich  $C$  als Steigung und  $V_M$  als Ordinatenabschnitt bestimmen lassen<sup>[231]</sup>. Die spezifische Oberfläche lässt sich schließlich mit dem ermittelten Volumen der adsorbierten monomolekularen Schicht, der AVOGADRO-Konstanten  $N_A$ , dem Flächenbedarf eines Gasmoleküls  $a_m$ , dem molaren Volumen  $V_m$  und der Probemasse  $m$  wie folgt berechnen:

$$S_m = \frac{V_M \cdot N_A}{V_m \cdot m} \cdot a_m. \quad (2.9)$$

Die Porengrößenverteilung für Poren größer als 2 nm wird nach der KELVIN-Methode mittels der Kapillarkondensations-Gleichung unter Berücksichtigung der Temperatur  $T$ , der universellen Gaskonstanten  $R$ , der Oberflächenspannung, dem molaren Volumen, dem Relativdruck und dem Kontaktwinkel berechnet<sup>[231,257]</sup>:

$$r_K = -\frac{2 \cdot \sigma \cdot V_m}{R \cdot T \cdot \ln \frac{p}{p_0}} \cdot \cos \vartheta. \quad (2.10)$$

Der eigentliche Porenradius  $r_p$  ergibt sich für zylindrische Poren<sup>[258]</sup> aus der Summe des Kelvinradius  $r_K$  und der Schichtdicke des Adsorbats  $t$ <sup>[231]</sup>:

$$r_p = r_K + t. \quad (2.11)$$

Für die Bestimmung von  $t$  gibt es einige Modelle, am häufigsten wird jedoch das Modell nach DE BOER verwendet<sup>[249,259]</sup>:

$$t = 0,1 \text{ nm} \cdot \sqrt{\frac{13,99}{0,034 - 0,4343 \cdot \ln \frac{p}{p_s}}}. \quad (2.12)$$

### 2.3.3 Inverse Gel-Permeationschromatographie (ISEC)

Die Gel-Permeationschromatographie<sup>[260]</sup> (GPC), auch unter den Bezeichnungen Größenausschlusschromatographie<sup>[261]</sup> (engl. *Size Exclusion Chromatography*, SEC), Gel-Filtrationschromatographie<sup>[262]</sup> sowie Molekularsiebchromatographie<sup>[263]</sup> bekannt, trennt

Moleküle nicht aufgrund ihrer chemischen Eigenschaften wie ihrem Löslichkeitsverhalten oder ihrer Affinität, sondern aufgrund ihrer hydrodynamischen Volumina<sup>[264–268]</sup>. Kleinere Moleküle gelangen in die Poren der stationären Phase, in denen sie sich durch Diffusion bewegen. Ihre Elution wird dadurch verzögert<sup>[269]</sup>. Große Moleküle, für die die Poren unzugänglich sind, passieren die Säule axial mit der mobilen Phase und eluieren früher<sup>[269,270]</sup>. Anwendung findet sie vor allem bei der Auftrennung von Polymeren<sup>[269]</sup>. Die Kalibrierung erfolgt über Standards bekannter Molmasse, indem der Logarithmus des Produkts von Molmasse und intrinsischer Viskosität in Abhängigkeit des Elutionsvolumens aufgetragen wird.

Bei der inversen Gel-Permeationschromatographie (ISEC) wird umgekehrt die unbekannte Porengrößenverteilung eines Trägermaterials durch Polymer-Standards mit bekannter Molmasse und enger Molmassenverteilung bestimmt<sup>[270]</sup>. Entwickelt wurde sie von AGGEBRANDT und SAMUELSON<sup>[271,272]</sup>, die die Porengrößenverteilung in Cellulosefasern mit PEGs als Standards bestimmen wollten. Durch zahlreiche Arbeiten<sup>[269,273–285]</sup>, vor allem durch die von HALÁSZ und MARTIN<sup>[269,286]</sup>, wurde sie im Weiteren optimiert. Mit der ISEC werden chromatographisch zugängliche Poren erfasst, weshalb sie auch als chromatographische Porosimetrie bezeichnet wird<sup>[287]</sup>. Sie ist besonders für Porosimetrieuntersuchungen solvensgefüllter und gequollener Materialien geeignet, die sich mit der Stickstoffadsorption oder der Quecksilber-Intrusionsporosimetrie nicht messen ließen und wurde auch bereits gezielt für Untersuchungen der Quellungsporosität eingesetzt<sup>[288]</sup>. Zu untersuchten Materialien gehören Silica<sup>[281,285,289,290]</sup>, Aluminiumoxide<sup>[289]</sup>, hydrophile Gele<sup>[284,289,291–294]</sup> und synthetische polymerbasierte Gele für die GPC<sup>[295]</sup>.

Mit der ISEC lassen sich die externe  $\epsilon_e$  (Gleichung 2.13), interne  $\epsilon_i$  (Gleichung 2.14) und totale  $\epsilon_t$  Porosität (Gleichung 2.15) durch das Verhältnis des interpartikulären Volumens  $V_e$  bzw. intrapartikulären Porenvolumens  $V_i$  zum Säulenvolumen  $V_s$  berechnen. Die totale Porosität ergibt sich aus der Summe der beiden<sup>[269]</sup>:

$$\epsilon_e = \frac{V_e}{V_s}, \quad (2.13)$$

$$\epsilon_i = \frac{V_i}{V_s}, \quad (2.14)$$

$$\epsilon_t = \epsilon_i + \epsilon_e. \quad (2.15)$$

Das Säulenvolumen ist durch die geometrischen Abmessungen der Säule bekannt<sup>[286]</sup>. Das interpartikuläre Volumen lässt sich über das kleinste Elutionsvolumen  $V_{e,min}$  des Moleküls bestimmen, das zu groß ist, um in die Poren zu diffundieren. Das Molekül mit

dem kleinsten hydrodynamischen Volumen weist hingegen das größte Elutionsvolumen  $V_{e,max}$  auf<sup>[296]</sup>, für dessen Bestimmung in der Regel Toluol in Tetrahydrofuran eingesetzt wird. Das intrapartikuläre Porenvolumen ergibt sich aus der Differenz<sup>[286]</sup>:

$$V_i = V_{e,max} - V_{e,min}. \quad (2.16)$$

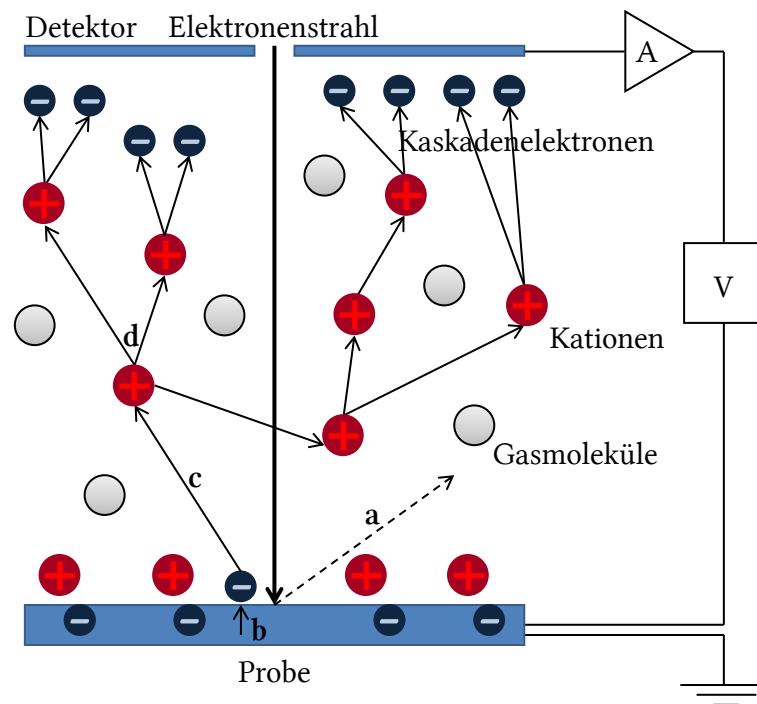
Für die Bestimmung der Porengrößenverteilung und spezifischen Oberfläche werden Poren im Bereich von 0,5-600 nm erfasst<sup>[288]</sup>. Unter der Voraussetzung, dass  $V_n$  das partielle Volumen der Poren mit einem Durchmesser gleich oder größer  $R_n$  ist und  $V_{n+1}$  das der Poren mit einem Durchmesser gleich oder größer  $R_{n+1}$  ( $R_{n+1} > R_n$ ), ergibt sich das Porenvolumen von Poren größer als  $R_n$ , aber kleiner als  $R_{n+1}$ , aus der Differenz der partiellen Volumina<sup>[269,270,297]</sup>:

$$\Delta V_{n+1,n} = V_{n+1} - V_n. \quad (2.17)$$

Eine zylindrische Porenform vorausgesetzt, kann mit  $R_h = 0,0246 \cdot M_r^{0,588}$  der hydrodynamische Radius  $R_h$  für einen Standard mit der relativen Molmasse  $M_r$  berechnet werden<sup>[272,286]</sup>.

Unter Verwendung organischer Eluenten, üblicherweise Tetrahydrofuran oder Dichlormethan, werden Polystyrol-Standards und unter Verwendung wässriger Eluenten biochemische Polymere wie Dextran- oder Pullulan-Standards<sup>[288]</sup> als Sondenmoleküle eingesetzt<sup>[270]</sup>. Die Standards dürfen nicht an die Matrix, die nicht quellen oder schrumpfen darf, adsorbieren und müssen schnell auf die Säule injiziert werden. Des Weiteren muss sich das Gleichgewicht zwischen dem fließenden und dem in den Poren stagnierenden Eluenten schnell einstellen und die Flussrate sowie Temperatur konstant gehalten werden.<sup>[269]</sup>

Der Vorteil gegenüber der Gasadsorption und der Quecksilber-Intrusionsporosimetrie ist, dass die Materialien vor allem im Hinblick auf Monolithe z. B. durch Pulverisieren nicht zerstört werden und keine hohen Drücke bzw. hohen Temperaturen nötig sind, die das Material beschädigen können. Zudem werden auch nur die im späteren Chromatographieexperiment zugänglichen Poren und die für die Anwendung tatsächliche Porengrößenverteilung, Porosität und spezifische Oberfläche erfasst. Für Materialien mit Poren größer als 600 nm, wie z. B. den meisten Polymermonolithen, ist sie aber nicht einsetzbar.



**Abbildung 2.12.** Signalentstehung bei einem Environmental Scanning Electron Microscope (ESEM)<sup>[verändert nach [301,304]]</sup>, (a) zurückgestreute Elektronen, (b) von Probe emittierte Sekundärelektronen, (c) Ionisierung von Gasmolekülen im Probenraum, (d) ausgelöste Elektronenkaskade.

### 2.3.4 Environmental Scanning Electron Microscope (ESEM)

Das ESEM wurde als eine Variante des Rasterelektronenmikroskops (REM) von DANILATOS<sup>[298–300]</sup> entwickelt und ist seit Ende der 1980er Jahre kommerziell erhältlich<sup>[301]</sup>. Im Gegensatz zum REM herrscht im Probenraum anstelle eines Hochvakuums eine Gasatmosphäre mit einem Druckbereich von 13–1300 Pa. Neben Wasserdampf werden auch Kohlenstoffdioxid, Argon, Helium und Stickstoff als Gase eingesetzt<sup>[301]</sup>. Das ESEM eignet sich daher für die Untersuchung nasser Proben<sup>[302]</sup> wie z. B. biologischer Proben<sup>[303]</sup> in ihrem nativen Zustand<sup>[301]</sup>. Der Elektronenstrahl, der die Probe abstrahlt, befindet sich aber wie beim REM im Hochvakuum ( $10^{-7}$ – $10^{-8}$  kPa), sodass sich der Druck in Druckzonen von der Elektronenstrahlquelle hin zur Probe allmählich erhöht<sup>[304]</sup>.

Beim Auftreffen des Elektronenstrahls auf die Probe werden durch elastische Stöße, wie in Abbildung 2.12 skizziert, zurückgestreute Elektronen mit Energien  $\geq 50$  eV erzeugt (a) und durch inelastische Stöße zwischen Probe und Strahl niederenergetische Sekundärelektronen mit Energien  $\leq 50$  eV emittiert (b)<sup>[304]</sup>. Die Elektronen ionisieren das im Probenraum vorhandene Gas (c) und lösen eine Kaskade aus (d), die zu einer Verstärkung des Signals führt, noch bevor es auf dem Detektor auftrifft<sup>[301]</sup>. Eine Streuung der

Elektronen durch die Gasatmosphäre auf dem Weg zum Detektor wird durch einen kurzen Abstand vermieden.

Die bei der Ionisierung der Gasmoleküle entstandenen Kationen bewegen sich durch eine angelegte Spannung in Richtung der Probe und neutralisieren die bei Isolatoren akkumulierte Ladung. Elektrisch nicht leitende Proben wie Polymere, poröse Materialien und Keramiken<sup>[301]</sup> müssen somit nicht wie bei Messung mit einem konventionellen REM zur Verbesserung der Leitfähigkeit metallisch beschichtet werden<sup>[304]</sup>.

### 2.3.5 Bestimmung der Härte nach SHORE

Mit der Härteprüfung nach SHORE lässt sich die Härte von Elastomeren bestimmen. Es wird der Widerstand des Materials gegen das Eindringen eines Eindringkörpers mit definierter Federkraft gemessen. Die Eindringtiefe ist das Maß für die Härte, die durch eine dimensionslose Skala von 0-100 ausgedrückt wird. Dabei entspricht eine Eindringtiefe von 2,5 mm der Härte 0 und eine Eindringtiefe von 0 mm einer Härte von 100<sup>[305]</sup>. Die Verfahren SHORE A und D unterscheiden sich in der Geometrie des Eindringkörpers. Bei der Prüfung nach SHORE A handelt es sich um einen Kegelstumpf mit einem Öffnungswinkel von  $35 \pm 0,25^\circ$  und einem Durchmesser von  $0,79 \pm 0,01$  mm. Nach SHORE D hat der Eindringkörper eine kugelförmige Spitze mit einem Durchmesser von  $0,1 \pm 0,01$  mm und einen Öffnungswinkel von  $30 \pm 1^\circ$ <sup>[306]</sup>. Die Probe muss für die Prüfung nach DIN 53505<sup>[306]</sup> einen Durchmesser von  $\geq 35$  mm und eine Dicke von  $\geq 6$  mm aufweisen. Die Temperatur sollte  $23 \pm 2^\circ\text{C}$  betragen. Eine Prüfung nach Typ A ist für weiche Materialien empfohlen, wenn die Prüfung nach Typ D eine geringere Härte als 20 ergibt. Umgekehrt ist eine Prüfung nach Typ D für härtere Materialien anzuwenden, wenn die Prüfung nach Typ A eine Härte größer als 90 ergibt<sup>[305]</sup>. Neben der Prüfung nach SHORE gibt es auch das Verfahren der Bestimmung der Kugeldruckhärte nach dem Internationalen Gummihärtegrad (IRHD)<sup>[307,308]</sup>.

### 2.3.6 Bestimmung der Proteinbindungskapazität

Zur Bestimmung der Proteinbindungskapazität, unter der die auf der Matrix immobilisierte Proteinmenge verstanden wird, werden in erster Linie fünf bewährte Farbreaktionen zur Bestimmung von Proteinen in Lösung genutzt. Ninhydrin<sup>[309]</sup> reagiert unter Reduktion mit primären Aminen zu einem farbigen Komplex, der auch unter dem Namen RUHEMANNS PURPUR bekannt ist und bei 570 nm maximal absorbiert. Coomassie Brilliant Blue<sup>[310]</sup> (BRADFORD<sup>[311]</sup>) ist ein blauer Farbstoff, der unter sauren Bedingungen an Proteine bindet. Der Bicinchoninsäure-Assay (BCA)<sup>[312,313]</sup> basiert auf der Reduktion von



Kupfer(II)-Ionen durch Peptidbindungen zu Kupfer(I)-Ionen, die mit BCA einen violett gefärbten Chelatkomplex bilden, der bei 562 nm quantifiziert wird<sup>[314]</sup>. 2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäure reagiert mit primären Aminen, Hydrazinen und Thiolen zu einem orangefarbenen Produkt. Die Farbintensität hängt dabei von der funktionellen Gruppe ab, mit der das Reagenz reagiert<sup>[315]</sup>. Thiolgruppen können mit Hilfe des ELLMAN-Reagenzes<sup>[316–319]</sup> 5,5'-Dithio-*bis*(2-nitrobenzoesäure) (DTNB) nachgewiesen und quantifiziert werden, das im Basischen in einer Thiol-Disulfid-Austauschreaktion mit den nachzuweisenden Thiolen reagiert. Dabei wird 2-Nitro-5-thiobenzoessäure (TNB) abgespalten, das in seiner deprotonierten Form ( $pK_S$ -Wert = 4,41<sup>[320–322]</sup>) als gelbes Farbstoffprodukt 2-Nitro-5-thiobenzoat ( $TNB^{2-}$ ) vorliegt und bei 412 nm detektiert wird.

Bei der Differenz-Methode wird durch Messung der Fluoreszenz<sup>[323]</sup> oder der Absorption bei z. B. 280 nm die Abnahme der Ligand-Konzentration in der Immobilisierungslösung bestimmt. Die Differenz entspricht der immobilisierten Ligandmenge. Kopplungsreagenzien dürfen die Absorption oder Fluoreszenz aber nicht überlagern. So kann es z. B. bei Verwendung von 1,1'-Carbonyldiimidazol durch Bildung von Imidazol zu Überlagerungen der Absorption bei 280 nm kommen<sup>[315]</sup>. Außerdem muss der Konzentrationsunterschied groß genug sein, um detektierbar zu sein. Wenn es nicht möglich ist, den Liganden direkt zu bestimmen, wird die Menge des angereicherten Analyten bestimmt und auf das Volumen bzw. die Masse des Trägers bezogen. Dieser Wert wird in der Regel als Kapazität bezeichnet und für Affinitätsträger angegeben.

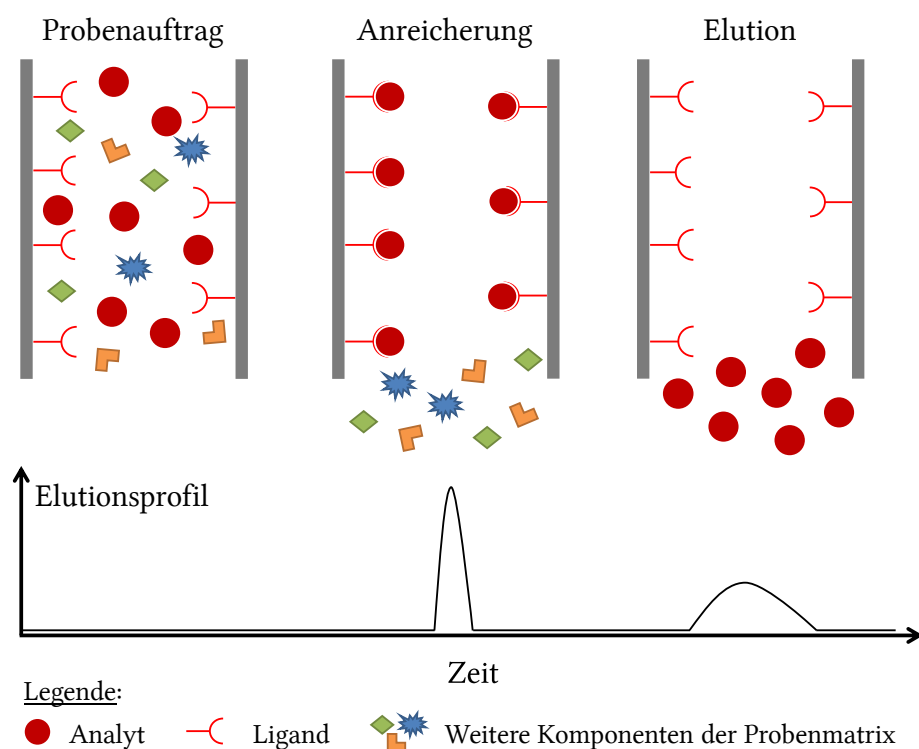
## 2.4 Affinitätschromatographie

In diesem Abschnitt werden neben dem Prinzip der Affinitätschromatographie ausgewählte Funktionalisierungstechniken für epoxidbasierte Trägermaterialien vorgestellt, wie sie im Speziellen für epoxidbasierte Monolithe genutzt werden.

### 2.4.1 Prinzip

Die Affinitätschromatographie<sup>[324–326]</sup> ist eine Methode zur selektiven Anreicherung von Biomolekülen. Sie basiert auf der reversiblen und bioselektiven Wechselwirkung eines auf einem Träger immobilisierten Liganden und eines Analyten in der mobilen Phase. Die Trennung erfolgt auf Basis der individuellen chemischen Struktur des Analyten. Das Prinzip der Affinitätschromatographie ist in Abbildung 2.13 bildlich wiedergegeben.

Sie kann genutzt werden, um aktive Biomoleküle von ihren denaturierten Formen zu trennen, um Substanzen, die nur in geringer Konzentration vorliegen, anzureichern oder um Kontaminationen zu entfernen. Daneben wird sie auch zur Untersuchung biologi-



**Abbildung 2.13.** Prinzip der Affinitätschromatographie.

scher Wechselwirkungen und zur Präparation von Proben für die Massenspektrometrie eingesetzt. Außerdem ist sie als einstufiger Prozess im Vergleich zu anderen Aufreinigungstechniken oft zeitsparend<sup>[327]</sup>.

Mögliche Bindungspaare können z.B. Enzym und Inhibitor, Antikörper und Antigen, Hormon und Rezeptor oder Oligonukleotide und ihre komplementären Stränge sein. Die Affinität des Liganden muss sich nicht auf die selektive Bindung eines einzelnen Moleküls beschränken, sondern kann sich im Fall gruppenspezifischer Liganden auch auf eine gesamte Stoffklasse beziehen. Aus Organismen gewonnene biologische Liganden können mit anderen Biomolekülen kontaminiert sein und die Reproduzierbarkeit zwischen einzelnen Chargen ist nicht unbedingt gegeben. Aus diesem Grund besteht Interesse an der Entwicklung biomimetischer Liganden. Molecular Imprinting, bei dem eine für den Analyten passende Polymerschablone mit komplementären Wechselwirkungsbedingungen für eine hohe Affinität erstellt wird, wurde als alternative Variante vielfach beschrieben<sup>[328]</sup>.

Die Bindung zwischen Ligand und Analyt kann auf elektrostatischen, hydrophoben, Van-der-Waals-Wechselwirkungen und auf Wasserstoffbrückenbindungen beruhen und sollte eine Gleichgewichtsdissoziationskonstante  $K_D$  im Bereich von  $10^6$  bis  $10^8 \text{ M}^{-1}$  aufweisen<sup>[327]</sup>. Sie muss für die selektive Bindung des Analyten stark genug sein und sich im

Elutionsschritt zur Isolierung des Analyten wieder lösen lassen. Die Elution kann durch Zugabe eines zum Analyten kompetitiven Reagenzes spezifisch erfolgen. Oft wird sie jedoch unspezifisch durch Änderung der Ionenstärke, z. B. über die Molarität von Natriumchlorid oder durch Änderung des pH-Werts bzw. der Polarität des Elutionspuffers induziert<sup>[329]</sup>. In seltenen Fällen wird zwischen Ligand und Analyt eine kovalente Bindung wie z. B. eine Disulfidbrücke geknüpft, die im Elutionsschritt gespalten wird<sup>[327]</sup>. Erste Entwicklungen von Trägermatrices und Kopplungstechniken sind aus dem Jahr 1910 bekannt, bei denen als Ligand Amylase an Stärke gekoppelt wurde<sup>[330]</sup>. Optimierungen der Trägermaterialien und der Kopplungschemie führten letztlich zur Etablierung der Affinitätschromatographie<sup>[331–334]</sup>. Heutzutage sind viele Trägermatrices auf Basis von Silica, Polyacrylamid, Dextrose, Poly(styrol-co-divinylbenzol) und vor allem Agarose (Partikelgröße 40-300 µm) und Cellulose (Partikelgröße 100-250 µm), die unter den Handelsnamen Sepharose® bzw. Sephadex® (GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg) und Affi-Gel® (Bio-Rad Laboratories GmbH, München) bekannt sind, erhältlich. Zu neuartigen Materialien zählen unter anderem monolithische Phasen<sup>[136]</sup>, Perfusions- und magnetische Partikel<sup>[327]</sup>. Die Matrix muss vielen Anforderungen genügen. Sie sollte funktionalisierbar sowie chemisch inert und physikalisch robust sein, um gegenüber Lösungsmitteln, pH-Wert-Schwankungen und gegebenenfalls Enzymen oder Mikroben stabil zu sein<sup>[327]</sup>. Außerdem sollte sie eine hydrophile und ungeladene Oberfläche aufweisen, damit hydrophobe und ionische unspezifische Bindungen vermieden werden. Die Porengröße sollte für die optimale Erreichbarkeit nach RENKIN<sup>[335]</sup> ca. fünfmal so groß wie das zu isolierende Biomolekül sein. Bei einer aus Partikeln bestehenden Phase ist eine monodisperse Größenverteilung von Vorteil, weil kleinere Partikel Zwischenräume ausfüllen und dadurch den Durchfluss behindern können<sup>[327,329]</sup>. Kleinere Partikel generieren zwar eine größere spezifische Oberfläche, können aber zur Blockierung der Säule und infolgedessen zu höheren Gegendrücken führen, die wiederum eine Kompression der Partikel zur Folge haben können. Die gewählte Partikelgröße stellt einen Kompromiss zwischen einer hohen Kapazität und einer guten Permeabilität der Säule dar. Weiche, gelartige Matrices werden oft zu Lasten der Porosität und Kapazität für eine bessere mechanische Stabilität vernetzt<sup>[327]</sup>. Eine zu hohe Kapazität kann aber durch sterische Hinderungen und/oder durch zu starke Bindung des Liganden die effektive Kapazität auch erniedrigen<sup>[336]</sup>.

Nicht nur die Matrix muss eine gewisse Stabilität aufweisen, sondern auch die Liganden müssen gegenüber den Kopplungs- und Elutionsbedingungen unempfindlich sein. Sie werden überwiegend kovalent an die Matrix gekoppelt, wobei sich ihre Affinität ändern kann. Eine gezielte Orientierung der Ligandkopplung ist durch Kopplung über biospezifische Wechselwirkungen wie beim Biotin-Streptavidin-Komplex möglich<sup>[327,329]</sup>. Wenn

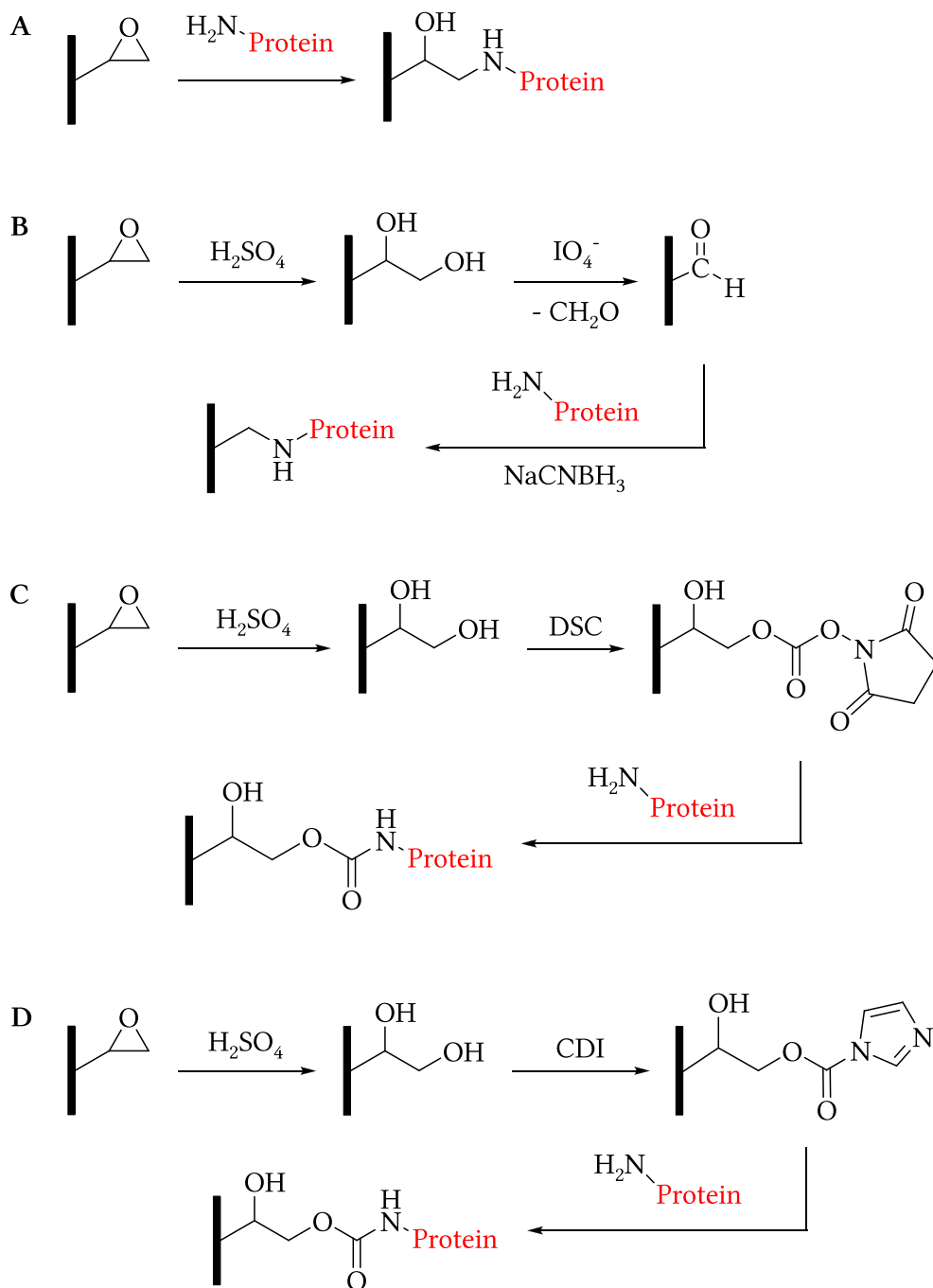
die Bindung des Analyten an den Liganden sterisch gehindert ist, kann der Ligand über einen Spacer an die Matrix gebunden werden<sup>[336]</sup>. Der Spacer sollte hydrophil sein, um unspezifische Bindungen zu vermeiden und eine optimale Länge besitzen. Bei einer zu kurzen Länge ist er wirkungslos. Ist er aber zu lang, kann es zu unspezifischen Bindungen kommen oder durch Faltung die Kapazität sogar reduziert werden<sup>[327,329]</sup>.

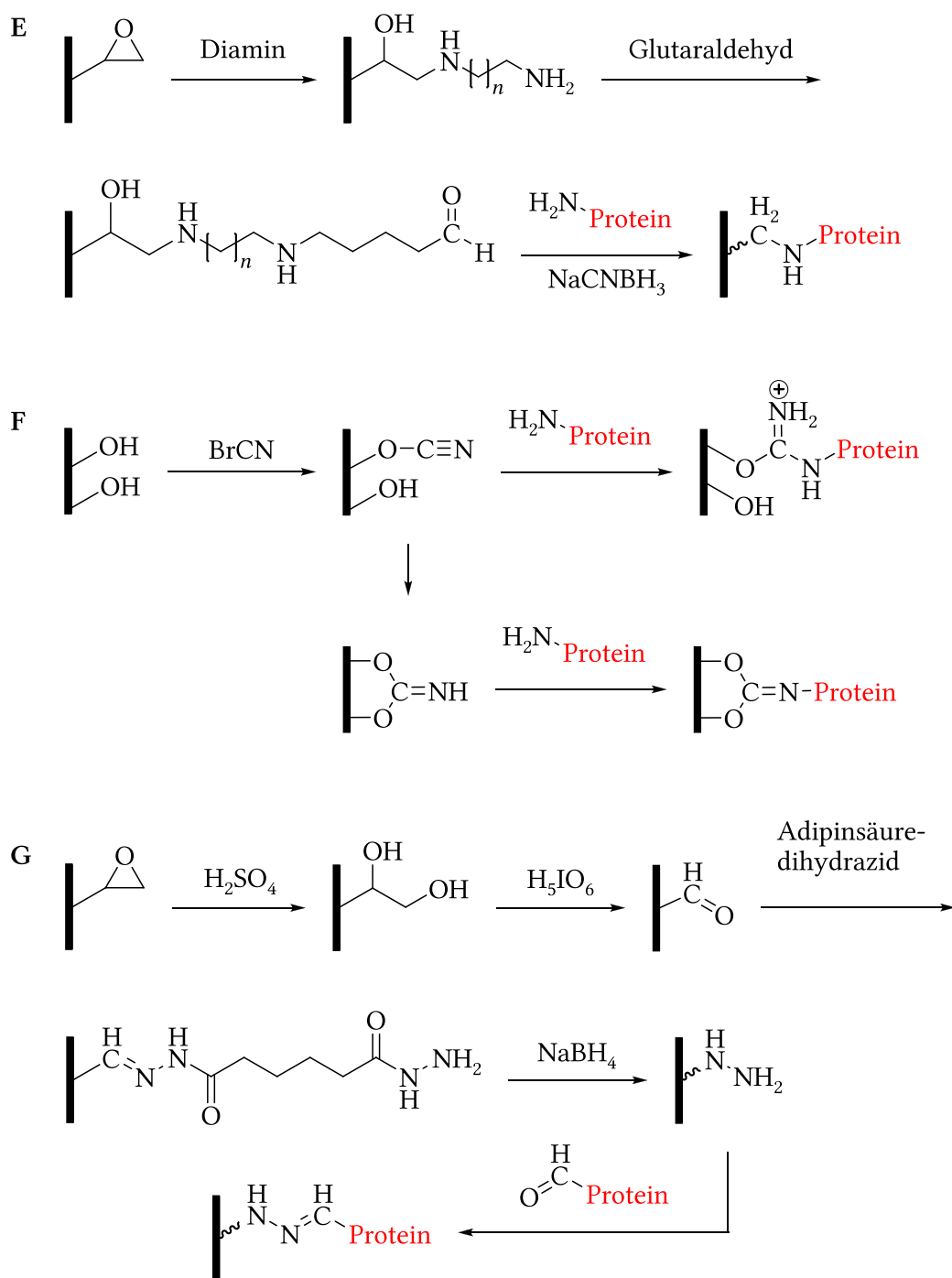
Antikörper oder deren Fragmente finden zunehmend in der Therapie, Diagnostik und in immunchemischen Methoden zu Forschungszwecken Anwendung. Die Aufreinigung von insbesondere Immunglobulin G (IgG) ist deshalb von industrieller Bedeutung und erfolgt über die Affinität der konstanten Region F<sub>c</sub> (*crystallizable* Fragment) zu Protein A, das aus *Staphylococcus aureus* oder zu Protein G<sup>[337]</sup>, das aus *Streptococcus* gewonnen wird. Die Affinitätsstärke der Proteine zu Immunglobulinen der Klasse G ist dabei sowohl vom Organismus, aus dem die Antikörper isoliert wurden, als auch von ihrer Subklasse abhängig, weswegen häufig Affinitätsäulen mit der Ligandkombination Protein A und G eingesetzt werden<sup>[327]</sup>.

### 2.4.2 Ausgewählte Funktionalisierungstechniken

Liganden wie z. B. Proteine werden überwiegend kovalent an die Matrix gebunden. Die Anbindung kann z. B. über die Aminofunktion der im Protein gebundenen Lysine erfolgen. Für die Kopplung von Aminoliganden an epoxidbasierte Träger gibt es zahlreiche Techniken, die in Abbildung 2.14 zusammengestellt sind<sup>[117,136,314,338,339]</sup>. Die Epoxidmethode (**A**), bei der das Amin die Epoxidgruppe direkt nukleophil angreift, ist das einfachste Verfahren<sup>[117]</sup>. Sie wird im Basischen durchgeführt, damit das Amin nicht in seiner unreaktiven protonierten Form vorliegt. Auf diese Weise können auch andere Nukleophile wie Thiole oder Hydroxylgruppen kovalent binden<sup>[136]</sup>. Die Reaktionskinetik ist allerdings langsam, sodass hohe Ligandkonzentrationen und lange Reaktionszeiten nötig sind<sup>[136]</sup>. Andere Techniken gehen nach einer sauren Hydrolyse des Epoxids vom Diol aus. Amine lassen sich nach Oxidation der Hydroxylgruppe zum Aldehyd über eine Glycolspaltung mit Natriumperiodat oder Periodsäure durch eine SCHIFFSche-Base-Reaktion (**B**) binden. Die SCHIFFSche-Base-Reaktion ist reversibel, weshalb das gebildete Imin mit Cyanoborhydrid zu einem sekundären Amin reduziert wird, auch reduktive Aminierung genannt. Nicht umgesetzte Aldehydgruppen werden mit Borhydrid zu Hydroxylgruppen reduziert oder mit niedermolekularen Aminen umgesetzt. Kritisch bei dieser Methode sind die Reduktionsmittel, die den Liganden nicht denaturieren sollen. Die Kinetik ist, verglichen mit der der Epoxidmethode, schneller<sup>[117,338,340]</sup>.

Die generierten Hydroxylgruppen können ebenso über die Zwischenstufe eines aktivierten Esters funktionalisiert werden. Dafür werden sie mit Di(*N*-succinimidyl)-carbonat





**Abbildung 2.14.** Kovalente Kopplungstechniken für Liganden mit Aminofunktion an ein epoxidbasiertes Trägermaterial: **(A)** Epoxid-Methode, **(B)** SCHIFFSche-Base-Methode, **(C)** Di(*N*-succinimidyl)-carbonat-Methode (DSC-Methode), **(D)** Carbonyldiimidazol-Methode (CDI-Methode), **(E)** Glutaraldehyd-Methode, **(F)** Bromcyan-Methode, **(G)** Hydrazid-Methode<sup>[136,314]</sup>.

(DSC) (C) oder 1,1'-Carbonyldiimidazol (CDI) (D) umgesetzt. In einer sich anschließenden nukleophilen Substitution wird der Aminoligand als Amid gebunden. Nachteilig ist die Hydrolyseempfindlichkeit des aktivierten Esters<sup>[314]</sup>. Außerdem wurde beobachtet, dass die Aktivität des Liganden nach Kopplung mit der CDI-Methode geringer ist, als nach Immobilisierung mittels SCHIFFscher-Base-Reaktion<sup>[314]</sup>.

Bei der Glutaraldehyd-Methode (E) wird zunächst eine Diaminbrücke wie z. B. Ethylen-diamin gebunden, an die Glutaraldehyd gekoppelt wird. Die Immobilisierung des Amins erfolgt anschließend analog einer SCHIFFschen-Base-Reaktion<sup>[340,341]</sup>.

Die Bromcyan-Methode (F) ist für die Funktionalisierung konventioneller Affinitätsmaterialien die bekannteste Methode. Die Kopplung erfolgt unter milden Bedingungen (pH 7,5-8,5) und kann über ein Imidocarbonat oder einen reaktiveren Cyanoester erfolgen. Die Ligandbindung ist im Vergleich zu den bisher beschriebenen Methoden jedoch labiler. Zudem ist Cyanbromid toxisch und unter Bildung des Cyanoesters können bei neutralem pH-Wert Ionenaustauschpositionen entstehen, die zu unspezifischen Bindungen führen können<sup>[314]</sup>.

Die Hydrazid-Methode (G) ist eine Kopplungstechnik, die für Glykoproteine und Kohlenhydrate geeignet ist. Hierbei wird der aldehydaktivierte Monolith mit Adipinsäuredihydrazid umgesetzt und der zu einem Aldehyd oxidierte Ligand<sup>[342]</sup> gekoppelt. Der Vorteil ist die orientierte Kopplung des Liganden, die eine höhere Aktivität des Liganden begünstigt<sup>[338,343]</sup>.

Neben einer kovalenten Immobilisierung ist auch eine biospezifische Adsorption möglich, bei der der Ligand über einen sekundären, kovalent an die Matrix immobilisierten Liganden adsorptiv gebunden wird. Beispiele sind die Bindungen zwischen Protein A bzw. G und IgG sowie zwischen Avidin und Streptavidin<sup>[314]</sup>. Desweiteren bilden Metallionen wie Kupfer(II) bzw. Nickel(II), die von Iminodiessigsäure oder Nitrilotriessigsäure gebunden werden, mit geeigneten Analyten Chelatkomplexe<sup>[314]</sup>.





# Kapitel 3

## Experimentelles

### 3.1 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden von den folgenden Firmen kommerziell erworben: Acros Organics, Fisher Scientific GmbH und Pierce Biotechnology, alle Teil von Thermo Fisher Scientific GmbH (Dreieich), abcr GmbH & Co. KG (Karlsruhe), Appli-Chem GmbH (Darmstadt), BioVision, Inc. (Milpitas, USA), Bruker Corporation (Billerica, USA), Euriso-Top GmbH (Saarbrücken), J.T. Baker, die zu Avantor Performance Materials Deutschland (Griesheim) gehören, Merck KGaA (Darmstadt), Raschig GmbH (Ludwigshafen), SERVA Electrophoresis GmbH (Heidelberg) und Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim), wozu auch Aldrich, Fluka, Sigma und Riedel-de Haën gehören.

Chemikalie (Reinheit)	Firma, Bestellnummer
Acetonitril ( $\geq 99,9\%$ )/ (für die LC/MS-Analyse)	J.T. Baker, 9012/ Fisher Scientific, 10799704
(3-Aminopropyl)trimethoxysilan (97 %) (APTMS)	Aldrich, 281778
Ammoniumdihydrogenphosphat	Sigma-Aldrich, A1645
Anti-Kaninchen IgG (ganzes Molekül, aus Ziege)	Sigma, R1131
Anti-Kaninchen-IgG-Peroxidase (ganzes Molekül, aus Ziege, $0,9\text{ mg mL}^{-1}$ )	Sigma, A6154, Lot 028K6035
BCA Protein Assay Kit	Pierce Biotechnology, 23227
Bortrifluoridetherat ( $\geq 46\% \text{ BF}_3$ )	Sigma, 320188

Bortrifluorid-Tetrahydrofuran-Komplex (47,5-49,5 %)	Aldrich, 434280
1,3-Butadiendiepoxid (97 %)/(95 %) ( $\rho = 1,11 \text{ g cm}^{-3}$ , BDE)	Aldrich, 202533, Lot 1436110V/ abcr, AB177798, Lot 1236967
1,4-Butandioldiglycidylether ( $\geq 95 \%$ ) ( $\rho = 1,10 \text{ g cm}^{-3}$ , BDG)	Aldrich, 220892, Lot MKBL8443V
Casein (Natriumsalz, aus Rindermilch)	Sigma, C8654
Chloroform ( $\geq 99,5 \%$ )	AppliChem, A1585
Chloroform (99,8 atom % D) ( $\text{CDCl}_3$ )	Aldrich, 151823
$\alpha$ -Cyan-4-hydroxyzimtsäure	Bruker, 201344
Cyclohexan (99,99 %)	Fisher Scientific, 10253470
L-Cystein ( $\geq 99 \%$ )	Acros Organics, 17360
Dichlormethan ( $\geq 98 \%$ )	Merck, 822271
Diethylether ( $\geq 99,9 \%$ )	Sigma-Aldrich, 309966
Dikaliumhydrogenphosphat ( $\geq 99,0 \%$ , wasserfrei)	Sigma, 60354
N,N-Dimethylacetamid ( $\geq 99,5 \%$ )	Sigma-Aldrich, 38839
Dimethylsulfoxid ( $\geq 99,5 \%$ ) (DMSO)	Sigma-Aldrich, 41648
Dimethylsulfoxid ( $\text{DMSO-d}_6$ )	Euriso-Top
Dinatriumhydrogenphosphat ( $\geq 99,0 \%$ / $\geq 99,5 \%$ , Dihydrat)	Sigma, 71643/AppliChem, A3905
1,4-Dioxan ( $\geq 99 \%$ , getrocknet)	AppliChem, A0790
5,5'-Dithio- <i>bis</i> (2-nitrobenzoesäure) ( $\geq 98 \%$ ) (DTNB)	Sigma, D8130
DL-Dithiothreitol ( $\geq 99,5 \%$ ) (DTT)	Sigma, 43815
( $\pm$ )-Epichlorhydrin ( $\geq 99 \%$ )	Fluka, 45340
Ethanol (96 %)	Merck, 100971
Ethylacetat ( $\geq 99 \%$ )	Fisher Scientific, 10080130
Ethylenglycoldiglycidylether ( $\rho = 1,19 \text{ g cm}^{-3}$ , EDG)	abcr, AB135790, Lot 1159189

Fractogel® EMD Epoxy (M) (40-90 µm)	Merck, 1.16961
GE 100 (EEW 145, $\rho = 1,22 \text{ g cm}^{-3}$ )	Raschig, 7040542135, Lot 11100038/018, CAS 90529-77-4, 25038-04-4
GE 500 (EEW 189, $\rho = 1,23 \text{ g cm}^{-3}$ )	Raschig, 7040541135, Lot 05100390/001 und 10110030/001, CAS 118549-88-5
Glycerol ( $\geq 99 \%$ )	Sigma, G5516
Glycin ( $\geq 99 \%$ )/( $\geq 99,5 \%$ )	Sigma, G7126/AppliChem, A3707
Immunglobulin G aus Kaninchenserum ( $\geq 95 \%$ , salzfrei, lyophilisiert) (IgG)	Sigma, I5006, Lot 091M7679V
Kaliumdihydrogencitrat ( $\geq 98,0 \%$ )	Fluka, 60215
Kaliumdihydrogenphosphat ( $\geq 99,5 \%$ , wasserfrei)	Fluka, 60219
Kaliumhydroxid-Plätzchen ( $\geq 85 \%$ )	AppliChem, A1575
Kaliumsorbit ( $\geq 99,0 \%$ )	Sigma-Aldrich, 85520
Kaninchenserum (sterilfiltriert)	Sigma, R4505, Lot 050M8408
Kieselgel 60 (0,04-0,063 mm)	Merck, 109385
Methanol ( $\geq 99,8 \%$ )	J.T. Baker, 8402
Methyl- <i>tert</i> -butylether (99,8 %, wasserfrei) (MTBE)	Sigma-Aldrich, 306975
Mordant Orange R (70 % Farbstoffgehalt)	Sigma-Aldrich, 195073
Natriumazid ( $\geq 99 \%$ )	Riedel-de Haën, 13412
Natriumborhydrid ( $\geq 96 \%$ , gepulvert)	AppliChem, A3821
Natriumcarbonat ( $\geq 99,5 \%$ , wasserfrei)	AppliChem, A3900/Sigma, 71345
Natriumchlorid (99,5 %)	Fluka, 71378/AppliChem, A1149
Natriumcyanoborhydrid (95 %)	Acros Organics, 168550100
Natriumdihydrogenphosphat, ( $\geq 99,0 \%$ , Dihydrat)	Fluka, 71502/AppliChem, A3902
Natriumhydrogencarbonat ( $\geq 99,5 \%$ )	AppliChem, A1940/Fluka, 71627

Natriumhydroxid-Plättchen (zur Analyse)/(≥ 98 %)	Merck, 106469/Sigma-Aldrich, 30620
Natriumperiodat (≥ 99,8 %)	Acros Organics, 419610050
Natriumsulfit (≥ 98 %, wasserfrei)	AppliChem, A1886
Pentaerythritol (≥ 99 %)	Aldrich, 236241
Periodsäure (≥ 99 %)	Acros Organics, 198401000
Phenolphthalein (1 % ethanolische Lösung)	Fisher Scientific, 10274200
Phosphorsäure (85 Gew.-%, 99,99 %)	Aldrich, 345245
rekombinantes Protein A (≥ 99 %, 50 mg ml <sup>-1</sup> in Wasser)	BioVision, 6500, Lot 51100 und 70900
Rinderserumalbumin (≥ 98 %, lyophilisiert) (engl. <i>Bovine Serum Albumin</i> , BSA)	Sigma-Aldrich, A7906, Lot SLBB3474V
Salzsäure (37 %/32 %, reinst)	AppliChem, A0625/Merck, 100313
Schwefelsäure (95-97 %)	J.T. Baker, 6057
Tetrabutylammoniumborhydrid (98 %)	Aldrich, 230170
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (98,0-102,0 %) (TMB)	SERVA Electrophoresis, 35926
Toluol (≥ 99,8 %)	AppliChem, A0527
Trifluoressigsäure (99 %) (TFA)	Sigma-Aldrich, T6508
2,2,4-Trimethylpentan (≥ 99,5 %) (Isooctan)	AppliChem, A0653
Tris(2,3-epoxypropyl)isocyanurat ( $\rho = 1,42 \text{ g cm}^{-3}$ [344], TEPIC)	Aldrich, 379506, Lot 05030KH
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (≥ 99,3 %) (Tris)	AppliChem, A1379
Tween <sup>®</sup> 20 (pure)	SERVA Electrophoresis, 37470
Wasserstoffperoxid (≥ 30 %)	Fluka, 95321
Xylencyanol FF (92,3 % Farbstoffgehalt)	Sigma, X4126
Porogene wurden über Molekularsieb (Dehydrat mit Indikator, 3 Å) von Fluka (69839) gelagert. Wasser wurde mit einem Milli-Q Synthesis/A10 Reinstwassersystem der Firma Millipore (Merck) aufbereitet.	

## 3.2 Puffer und Lösungen

Die pH-Werte wurden, falls nicht anders angegeben, mit Natronlauge (20 Gew.-%) bzw. Salzsäure (20 Gew.-%) eingestellt. Die Puffer wurden bei 4 °C gelagert und nicht länger als zwei Wochen verwendet. Die TMB-Lösung wurde frisch angesetzt.

Puffer und Lösungen	Zusammensetzung
APTMS-Lösung	1 Vol.-% (3-Aminopropyl)trimethoxysilan 1 Vol.-% Wasser methanolische Lösung
Carbonatpuffer, pH 9,6	30 mM Natriumcarbonat 70 mM Natriumhydrogencarbonat
Carbonatpuffer, pH 11,0	17 mM Natriumcarbonat 83 mM Natriumhydrogencarbonat
Citratpuffer, pH 4,0	220 mM Kaliumdihydrogencitrat 0,5 mM Kaliumsorbat
Glycin-HCl-Lösungen, pH 2,2, pH 2,0, pH 1,8	100 mM Glycin eingestellt mit konzentrierter Salzsäure
Indikatorlösung	3,5 mM Mordant Orange 1 1,1 mM Xylencyanol FF wässrige Lösung
MALDI-Matrix	115 µL gesättigte $\alpha$ -Cyano-4-hydroxymizsäure in Acetonitril/Tetrafluoressigsäure (0,1 Vol.-%) (90/10 (v/v)) 8 µL Tetrafluoressigsäure (10 Vol.-%) 8 µL Ammoniumdihydrogenphosphat (100 mM)

PBS, pH 7,6, pH 8,0

10 mM Natriumdihydrogenphosphat (Dihydrat)  
70 mM Dinatriumhydrogenphosphat (Dihydrat)  
145 mM Natriumchlorid

PBS, pH 6,0

307 mM Natriumdihydrogenphosphat (Dihydrat)  
193 mM Dinatriumhydrogenphosphat (Dihydrat)

PBS-A, pH 6,0

122,5 mM Natriumdihydrogenphosphat (Dihydrat)  
77,5 mM Dinatriumhydrogenphosphat (Dihydrat)

PBS-B, pH 8

5 mM Natriumdihydrogenphosphat (Dihydrat)  
95 mM Dinatriumhydrogenphosphat (Dihydrat)

PBS-T (60 ×), pH 7,6

45 mM Kaliumdihydrogenphosphat  
375 mM Dikaliumhydrogenphosphat  
1,5 mM Kaliumsorbit  
0,05 Vol.-% Tween® 20

Phosphorsäurelösung, pH 6

10 mM Phosphorsäure  
eingestellt mit 15 M Natronlauge

Substratlösung

262,5 µL TMB-Lösung  
4,05 µL Wasserstoffperoxid  
10 mL Citratpuffer

TMB-Lösung

8 mM Tetrabutylammoniumborhydrid  
40 mM 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin  
in *N,N*-Dimethylacetamid unter Argonatmosphäre

Tris, pH 8,5

10 mM Tris(hydroxymethyl)-aminomethan  
150 mM Natriumchlorid  
bzw.  
200 mM Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

### 3.3 Analytische Methoden

#### Auflichtmikroskop

Gerät	Stereomikroskop MZ 12.5
Firma	Leica Microsystems GmbH (Wetzlar)
Objektiv	1.0 × Plan
Okular	10 ×/21 B
Kaltlichtquelle	KL 1500 LCD
Firma	Lighting and Imaging Schott AG (Mainz)
Kamera	CMOS-USB2.0-CAMERA, UK-1175
Firma	EHD imaging GmbH (Damme)
Software	Image Capture 1.11.6
Tonwertkorrektur	Adobe® Photoshop® Elements 6.0.0.0 von Adobe Systems GmbH (München)

#### Durometer

Gerät	digi test Prüfeinrichtung, SHORE A
Firma	Bareiss Prüfgerätebau GmbH (Oberdischingen)
Federcharakteristika	vgl. DIN 53505:2000-08 <sup>[306]</sup>
Software	Hardtest 2.0

#### Environmental Scanning Electron Microscope (ESEM)

Gerät	Tabletop Microscope Hitachi TM-1000
Firma	Hitachi High-Technologies Corporation (Tokyo, Japan)
Detektor	Solid State Backscattered Electron Detector
Vergrößerung	20-10 000 × (Digital Zoom: 4 ×)
Probenbühne	X = 15 mm/Y = 18 mm
Max. Probengröße	70 mm Durchmesser, 20 mm Höhe
Vakuumsystem	Turbomolekularpumpe, Membranpumpe
Software	TM-1000 03-02-01
Tonwertkorrektur	Adobe® Photoshop® Elements 6.0.0.0 von Adobe Systems GmbH (München)

### Gasadsorption

Gerät	ASAP 2020™-Physisorption Analyzer
Firma	Micromeritics Instrument Corporation (Norcross, USA)
Druckbereich	0-127 kPa
Porenweiten	0,4-500 nm
	Porenweiten < 2 nm nach DIN 66135 <sup>[345]</sup>
	Porenweiten 2-50 nm nach DIN 66134 <sup>[346]</sup>
Gase	Stickstoff (0,162 nm <sup>2</sup> bei 77 K) <sup>[252]</sup>
	Krypton (0,202 nm <sup>2</sup> bei 77 K) <sup>[252]</sup>
Software	V3.05 H

### Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Gerät	Agilent 1100 Series
Firma	Agilent Technologies Deutschland GmbH (Böblingen)
Detektoren	Variabler Wellenlängendetektor (VWD), Verdampfungs- Lichtstreuendetektor (engl. <i>Evaporative Light Scattering Detector</i> , ELSD) PL-ELS 1000 der Firma Polymer Laboratories Ltd. (Agilent Technologies Deutschland GmbH, Böblingen)
Lichtquelle	Deuteriumlampe, 190-600 nm
Durchflussszelle	Standard: 10 mm optische Weglänge, V = 14 µL, max. 40 bar
Pumpe	Quaternär
Flussrate	0,1-5 mL min <sup>-1</sup>
Software	ChemStation B.04.01 (Steuerung, Auswertung), Origin 9.0.0G von OriginLab Corporation (Northampton, USA) (Darstellung)

Gerät	Agilent 1200 Series
Firma	Agilent Technologies Deutschland GmbH (Böblingen)
Detektor	Diodenarraydetektor (DAD)
Lichtquelle	Deuterium- und Wolframlampe 190-950 nm
Durchflussszelle	Standard: 10 mm optische Weglänge, V = 13 µL, max. 120 bar
Pumpe	Quaternär
Flussrate	0,1-5 mL min <sup>-1</sup>
Software	ChemStation B.04.01 (Steuerung, Auswertung), Origin 9.0.0G von OriginLab Corporation (Northampton, USA) (Darstellung)



Gerät	UltiMate® 3000
Firma	Dionex Softron GmbH (Germering)
Detektor	VWD
Lichtquelle	Deuterium- und Wolframlampe, 190-900 nm
Durchflusszelle	Mic-Messzelle: V = 180 nL, max. 200 bar
Pumpe	ternäre Niederdruck-Mikrogradientenpumpe als Ladepumpe
Flussrate	50-2500 $\mu\text{L min}^{-1}$
Software	Chromeleon 6.80 SR10 (Steuerung, Auswertung), Origin 9.0.0G von OriginLab Corporation (Northampton, USA) (Darstellung)

### Kernspinresonanzspektroskopie (NMR)

Gerät	AVANCE III 500
Firma	Bruker BioSpin GmbH (Rheinstetten)
Frequenz	$^1\text{H}$ : 500 MHz, $^{13}\text{C}$ : 126 MHz
Software	TopSpin 3.0 (Steuerung), MestRec 4.7.0.0 von Mestrelab Research (Santiago de Compostela, Spanien) (Auswertung)

Gerät	DMX 400
Firma	Bruker BioSpin GmbH (Rheinstetten)
Frequenz	$^1\text{H}$ : 400 MHz
Software	TOPSPIN 1.3 (Steuerung), MestRec 4.7.0.0 von Mestrelab Research (Santiago de Compostela, Spanien) (Auswertung)

### Massenspektrometrie (MS)

Gerät	Exactive Benchtop Orbitrap™
Firma	Thermo Fisher Scientific GmbH (Dreieich)
Ionenquelle	Elektrosprayionisation (ESI)
Analysator	Orbitrap
Spannung	Capillary Voltage 77 V, Tube Lens Voltage 55 V, Skimmer Voltage 14 V, Spray Voltage 3,8 kV
Software	Exactive 1.1 SP5 (Steuerung), Xcalibur 2.2 SP1 (Auswertung)

Gerät	Autoflex III Smartbeam
Firma	Bruker Daltonik GmbH (Bremen)
Ionenquelle	Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation (engl. <i>Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization</i> , MALDI)

Laser	Smartbeam Laser (355 nm), 200 Hz
Analysator	Flugzeitanalysator (engl. <i>Time-of-Flight</i> , TOF)
Spannung	24 kV
Mode	Linear
Software	FlexControl 1.3 (Steuerung), FlexAnalysis 1.0 (Auswertung)
Gerät	Q-TOF Ultima
Firma	Micromass (Waters GmbH, Eschborn)
Ionenquelle	ESI
Analysator	TOF
Spannungen	Capillary Voltage 3,4 kV, Cone Voltage 50 V, Collision Energy 15 eV
Software	Mass Lynx V4.1
Gerät	API 4000 <sup>™</sup> mit HPLC-Anlage Agilent Series 1100
Firma	Applied Biosystems <sup>®</sup> (Life Technologies Corporation, Darmstadt)

Theoretische Massen sind in Klammern hinter gemessenen angegeben und wurden mit ChemDraw Standard 12.0.2.1076 von Cambridge Soft (Waltham, USA) berechnet.

### **Pulverdiffraktometrie**

Gerät	D5000 Diffraktometer (Bragg-Brentano, CuK <sub>α</sub> -Strahlung)
Firma	Siemens AG (München)
Übersichtsmessung	8-80° 2θ
Schrittweite	0,02°, 2 s/Schritt
Datenbank	The International Centre for Diffraction Data (ICDD)
Software	Origin 9.0.0G von OriginLab Corporation (Northampton, USA) (Darstellung)

### **Quecksilber-Intrusionsporosimetrie**

Gerät	Autopore III, WIN9400 Series
Firma	Micromeritics Instrument Corporation (Norcross, USA)
Druckbereich	Niederdruck 0-0,345 MPa Hochdruck bis 414,000 MPa

Porenweiten	Niederdruck 360-3,6 $\mu\text{m}$ Hochdruck 6-0,003 $\mu\text{m}$ 4 nm bis ca. 300 $\mu\text{m}$ nach DIN 66133 <sup>[233]</sup>
Kontaktwinkel	140,000° nach DIN 66133 <sup>[233]</sup>
Oberflächenspannung	0,48 N m <sup>-1</sup> nach DIN 66133 <sup>[233]</sup>
Quecksilberdichte	13,5409 g cm <sup>-3</sup> nach Kalibrierung bei 22,2 °C
Software	V2.00 (Steuerung, Auswertung), Origin 9.0.0G von OriginLab Corporation (Northampton, USA) (Darstellung)

### UV/Vis-Spektroskopie

Gerät	Evolution 220 UV-Visible Spectrophotometer
Firma	Thermo Fisher Scientific GmbH (Dreieich)
Optik	Zweistrahlphotometer, Czerny-Turner-Monochromator
Lichtquelle	Xenon Blitzlampe
Spektrale Bandbreite	Variabel 1 nm, 2 nm
Wellenlängenbereich	190-1100 nm
Detektor	Zwei Silizium-Photodioden
Software	Insight 1.4.40 (Steuerung), Origin 9.0.0G von OriginLab Corporation (Northampton, USA) (Darstellung)
Gerät	SpectraMax Plus <sup>384</sup>
Firma	Molecular Devices (Germany) GmbH (Biberach an der Riss)
Lichtquelle	Xenon Blitzlampe
Spektrale Bandbreite	2 nm
Wellenlängenbereich	190-1000 nm
Software	SoftMax Pro 5.3 (Steuerung, Auswertung), Origin 9.0.0G von OriginLab Corporation (Northampton, USA) (Darstellung)

### 3.4 Geräte

Gerät, Bezeichnung	Firma
Aluminiumheizblöcke Sonderanfertigungen	Werkstätten der BAM (Berlin)
Analysenwaage Mettler AM100	Mettler-Toledo GmbH (Gießen)
Kappgerät KG 50	Proxxon GmbH (Föhren)
Magnetrührer, Kontaktthermometer MR Hei-Standard, EKT Hei-Con	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG (Schwabach)
MALDI-Target MTP AnchorChip™ 600/384	Bruker Corporation (Billerica, USA)
Mikrotiterplatten-Schüttler Titramax 101	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG (Schwabach)
Mikrotiterplatten-Waschautomat ELx405™ Select	BioTek Instruments GmbH (Bad Friedrichshall)
pH-Elektrode InLab® Micro	Mettler-Toledo GmbH (Gießen)
pH-Meter pH 211 Microprocessor pH Meter	HANNA Instruments Deutschland GmbH (Kehl am Rhein)
Pipetten Eppendorf Research® (variabel) Eppendorf Research® pro (Mehrkanal)	Eppendorf AG (Hamburg)
Pumpe Chemie-HYBRID™-Pumpe PC 8/RC 6 (max. $4 \cdot 10^{-4}$ bar)	Vacuubrand GmbH & Co. KG (Wertheim)
Rotationsverdampfer Laborota 4003 control	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG (Schwabach)
Spritzenpumpe LA-30 (max. Fluss $1600 \text{ mL h}^{-1}$ )	neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH (Heidelberg)

Temperaturmessgerät testo 925	Testo AG (Lenzkirch)
Temperaturfühler GTF 101 NiCr-Ni	Greisinger electronic GmbH (Regenstauf)
Thermomixer Thermomixer® comfort (Wechselblöcke 1,5 mL, 2 mL) Thermomixer® compact (Wechselblock 1,5 mL)	Eppendorf AG (Hamburg)
Thermostat Rotilabo®-Blockthermostat H 250	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe)
Trockenschrank Modell 5002	Memmert GmbH & Co. KG (Schwabach)
Ultramikrowaage UMT2	Mettler-Toledo GmbH (Gießen)
Vakuumdestillationsapparatur Sonderanfertigung	Glasbläserei Müller (Berlin)
Vakuumtrockenschrank Typ VT 6130 M-BL (für brennbare Lösungsmittel)	Thermo Fisher Scientific GmbH (Dreieich)/ Heraeus Holding GmbH (Hanau)
Vortexmischer Reax top	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG (Schwabach)
Zentrifuge Mikro 220R	Andreas Hettich GmbH & Co. KG (Tuttlingen)

### 3.5 Verbrauchsmaterialien

Material, Bezeichnung	Firma
Anschlussstücke F-120 (PEEK, für OD $1/16''$ )	IDEX Health & Science GmbH (Wertheim)
Blindstopfen P-520 (Edelstahl, für 10-32 Gewinde) P-551 (PEEK, für 10-32-Gewinde)	IDEX Health & Science GmbH (Wertheim)
Einmalspritzen mit -kanülen HSW NORM-JECT® (2-teilig, 1 mL, 5 mL) HSW FINE-JECT® (0,80 × 40 mm, 1,60 × 40 mm)	Henke-Sass, Wolf GmbH (Tuttlingen)
Einsätze Micro Insert (200 µL für 10 mm-Kurzgewindeflasche)	WICOM Germany GmbH (Heppenheim)
Entsalzungssäulen PD-10 Desalting Columns Zeba™ Spin Desalting Columns	GE Healthcare Europe GmbH (Freiburg) Pierce Biotechnology (Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich)
Gewindegläschen mit Schraubkappen 10 mm-Kurzgewindeflaschen (2 mL) Kappen (für 10 mm-Kurzgewinde Butylgummi/Teflon-Septum)	WICOM Germany GmbH (Heppenheim)
EPA Gewindeflaschen (20 mL, 24-400 Gewinde, 57 × 27,5 mm) Kappen (PP, für 24-400 Gewinde, Silikon/PTFE-Septum)	BGB Analytik Vertrieb GmbH (Rheinfelden)
Glasspritzen mit Kanülen 710 RN 100 µL Spritze (22s/51/2) RN-Kanülen (26/51/3)S	Hamilton Messtechnik GmbH (Höchst)

HPLC-Säulen	
Inertsil ODS-3 (5 µm, 250 × 4,6 mm)	GL Sciences, Inc. (Torrance, USA)
Onyx™ Monolithic Semi-Prep (C18, 100 × 10 mm)	Phenomenex, Inc. (Aschaffenburg)
UltraSep ES, Phen1 (5 µm, C18, 260 × 3 mm)	Sepserv Separation Service Berlin
Inline-Solvent-Filter A-313 (Edelstahl, 20 µm, für 10-32-Gewinde)	IDEX Health & Science GmbH (Wertheim)
Kapillaren	IDEX Health & Science GmbH (Wertheim)
1532 (PEEK, ID 500 µm, OD 1/16")	
U-155 (Edelstahl, ID 125 µm, OD 1/16")	
U-104 (Edelstahl, ID 500 µm, OD 1/16")	
Kapillarschneider	
A-327 Standard Polymer Tubing Cutter (für OD 1/16" und OD 1/8")	IDEX Health & Science GmbH (Wertheim)
Schneider für Edelstahlkapillaren	Gynkotek (Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich)
Kappen	IDEX Health & Science GmbH (Wertheim)
P-754 (ETFE, für 10-32-Gewinde)	
Klebepads	UHU GmbH & Co. KG (Bühl/Baden)
UHU patafix Klebepads	
Küvetten	Brand GmbH & Co. KG (Wertheim)
UV-Küvette mikro (70 µL, z = 8,5)	
Mikrotiterplatten	Greiner-Bio-One GmbH (Frickenhäusen)
UV-Star® Microplates (96 Well F-Boden (Kaminform), µClear)	
Microton 600 (96 Well, high binding F-Boden (Kaminform), glasklar)	
Nägel	Emil Lux GmbH & Co. KG (Wermelskirchen)
Eisennägel (0,8 × 11 mm)	

pH-Indikator	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG (Düren)
pH-Fix 0-14	
Universal-Indikator pH 1-14, Rolle	
Pipettenspitzen	Eppendorf AG (Hamburg)
epT.I.P.S. <sup>®</sup> Standard	
Reaktionsgefäße	Eppendorf AG (Hamburg)
Safe-Lock Gefäße <sup>™</sup>	
Sägeblätter	Proxxon GmbH (Föhren)
Trennscheibe mit Gewebe (50 × 1 × 10 mm)	
Schläuche	
FEP-Schlauch (ID 0,8 mm, OD 1/16")	Bohlender GmbH (Grünsfeld)
PTFE-Schlauch (0,5 × 1,6 mm)	Th. Geyer GmbH & Co. KG (Renningen)
PVC-Schlauch (4 × 6 mm)	neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH
Silikonschlauch (4 × 6 mm × 1 mm)	(Heidelberg)
Spatel	
Einmal-Rührspatel (PS)	neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH
	(Heidelberg)
Einwegspatel (mikro, antistatisch)	VWR International GmbH (Darmstadt)
Verbindungsstücke	IDEX Health & Science GmbH (Wertheim)
U-437 (Edelstahl, 10-32-Gewinde, für OD 1/16")	
Verschlussfolie	Pechiney Plastic Packaging (Chicago, USA)
Parafilm <sup>®</sup> M	
Zentrifugenröhrchen	neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH
(PP, konisch, 15 mL, 50 mL)	(Heidelberg)



## 3.6 Synthese polyfunktioneller Glycidylether

### 3.6.1 Pentaerythritoltetraglycidylether<sup>[nach [203]]</sup>

Es wurden 4,1 g Pentaerythritol (0,03 mol) unter Argon in einem Dreihalskolben vorgelegt und in 30 mL DMSO gelöst. Daraufhin wurden 13,5 g Kaliumhydroxid (0,24 mol, 2 äq./OH) als Feststoff hinzugefügt. Der Ansatz wurde auf 35 °C erwärmt und 28 mL Epichlorhydrin (0,36 mol, 3 äq./OH) wurden über einen Zeitraum von 1,5 h zugetropft. Die Mischung wurde bei 35 °C für 7 h gerührt und verfärbte sich gelblich/bräunlich. Anschließend wurde der Ansatz bei Raumtemperatur nochmals 14 h gerührt. Ein zweiter Ansatz wurde danach erneut bei 37 °C für 7 h und bei Raumtemperatur für 14 h gerührt. Der jeweils ausgefallene Feststoff wurde nach der Synthese abfiltriert und mit 300 mL Dichlormethan gewaschen, das unter vermindertem Druck entfernt wurde.

Ansatz 1 wurde anschließend mit gesättigter Kochsalzlösung (80 mL) und Diethylether (2 × 150 mL) extrahiert und der Diethylether unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde im Vakuum (0,1 mbar, 35-40 °C) destilliert sowie säulenchromatographisch mit der HPLC-Anlage Agilent 1100 Series aufgereinigt. Das Injektionsvolumen (2 mg mL<sup>-1</sup> in Methanol) betrug 20 µL. Als Säule diente eine Onyx Monolithic Semi-Prep (C18, 100 × 10 mm). Die Flussrate des Eluenten (Methanol/Wasser (50/50 (v/v))) betrug 3 mL min<sup>-1</sup>. Die Detektion erfolgte mit einem ELSD (5 bar Stickstoff, Methode 1 mit Neb = 40 °C, Evap = 80 °C, Gas = 1 SLM). Elutionsvolumina wurden zu den Zeiten 2,43-2,60 min, 2,70-3,17 min, 3,17-3,35 min und 3,40 min-3,90 min fraktioniert und massenspektrometrisch mit dem Gerät Q-TOF Ultima analysiert.

Ansatz 2 wurde ohne Extraktionsschritt nach Entfernen von DMSO unter vermindertem Druck säulenchromatographisch mit der HPLC-Anlage Agilent 1100 Series aufgereinigt. Der Eluent setzte sich aus Methanol/Wasser (45/55 (v/v)) zusammen. Das Injektionsvolumen (11 mg mL<sup>-1</sup> in Methanol/Wasser (7:3)) betrug 20 µL. Die weiteren Bedingungen waren denen von Ansatz 1 analog. Elutionsvolumina wurden zu den Zeiten 2,50-3,50 min, 3,50-4,10 min und 4,10-5,00 min fraktioniert und massenspektrometrisch mit dem Gerät Q-TOF Ultima analysiert. Das Elutionsvolumen des dritten Signals wurde von weiteren 18 Messungen fraktioniert, wobei die Volumina von drei Messungen jeweils vereinigt wurden. Die einzelnen Fraktionen wurden massenspektrometrisch mit dem Gerät Q-TOF Ultima analysiert. Außerdem wurde von der gesamten Fraktion ein Protonenspektrum mit dem Gerät AVANCE III 500 aufgenommen.

HPLC (Methanol/Wasser (45/55 (v/v))):  $t_R = 4,42$  min.

ESI-MS:  $[M+Na]^+ = 383,4$  (383,2).

$^1\text{H}$ -NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz)  $\delta$  [ppm]: 3,69 (ddd, 4 H,  $J = 2,7$  Hz, 11,8 Hz, 23,0 Hz); 3,52-3,43 (m, 8 H); 3,34 (dd, 4 H,  $J = 5,8$  Hz, 11,7 Hz); 3,12-3,08 (m, 4 H); 2,75 (dd, 4 H,  $J = 4,5$  Hz, 4,9 Hz); 2,57 (dd, 4 H,  $J = 2,7$  Hz, 5,0 Hz).

### 3.6.2 Glyceroltriglycidylether

#### Ansatz 1<sup>[nach [205]]</sup>

Es wurden 2,8 g Glycerol (0,03 mol) unter Argon in einem Dreihalskolben vorgelegt und 33  $\mu\text{L}$  Bortrifluoridetherat dazugegeben. Die Lösung wurde auf 60 °C erwärmt und 22 mL Epichlorhydrin (0,28 mol, 3 äq./OH) wurden über einen Zeitraum von 15 min zugetropft. Der Ansatz wurde 8 h bei 60 °C gerührt und verfärbte sich bräunlich. Anschließend wurde die Reaktionslösung auf 25 °C abgekühlt und 70 mL einer ethanolischen Natriumhydroxid-Lösung (2,6 M, 0,18 mol, 2 äq./OH) wurden langsam zugetropft. Die Lösung wurde farblos und ein weißer Feststoff fiel aus. Der Ansatz wurde weitere 12 h bei 25 °C gerührt. Nach der Reaktion wurde der Feststoff abfiltriert, mit Ethanol gewaschen, das unter reduziertem Druck entfernt wurde. Der hierauf im Filtrat erneut ausgefallene Feststoff wurde abfiltriert und mit Ethanol gewaschen, welches wieder unter vermindertem Druck entfernt wurde. Die Prozedur wurde nochmals wiederholt. Der gelblich gefärbte Ansatz wurde unaufgereinigt massenspektrometrisch mit dem Gerät Q-TOF Ultima untersucht.

#### Ansatz 2 und 3<sup>[nach [203]]</sup>

Es wurden 2,8 g Glycerol (0,03 mol) unter Argon in einem Dreihalskolben vorgelegt und 10 g Kaliumhydroxid (0,18 mol, 2 äq./OH) als Feststoff hinzugefügt. Der Ansatz wurde auf 40 °C erwärmt und 22 mL Epichlorhydrin (0,28 mol, 3 äq./OH) wurden über einen Zeitraum von 30 min zugetropft, wobei sich die Lösung leicht gelblich/bräunlich verfärbte. Anschließend wurde der Ansatz ca. 70 h bei 40 °C gerührt. Nach der Synthese wurde der Feststoff abfiltriert, mit 100 mL Dichlormethan gewaschen, das unter vermindertem Druck entfernt wurde. Die gelbliche Flüssigkeit wurde im Vakuum mit einer angefertigten Kurzwegvakuumdestillationsapparatur (0,06-0,008 mbar) destilliert und eine farblose Fraktion bei 177 °C isoliert. Die Fraktion wurde mittels NMR mit dem Gerät AVANCE III 500 und mittels MS mit dem Gerät Exactive Benchtop Orbitrap<sup>™</sup> analysiert. Ein dritter Ansatz wurde säulenchromatographisch mit Ethylacetat/Cyclohexan (3:7) als Eluent aufgereinigt.

$^1\text{H}$ -NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz)  $\delta$  [ppm]: 4,03 (ddd, 5 H,  $J = 1,5$  Hz, 6,3 Hz, 10,9 Hz); 3,75 (dd, 3 H,  $J = 2,8$  Hz, 11,5 Hz); 3,36 (dd, 3 H,  $J = 6,0$  Hz, 11,5 Hz); 3,16-3,12 (m, 3 H); 2,80 (dd, 3 H,  $J = 4,2$  Hz, 4,9 Hz); 2,60 (dd, 3 H,  $J = 2,7$  Hz, 5,0 Hz).

## 3.7 Monolithsynthese mit Tris(2,3-epoxypropyl)isocyanurat (TEPIC)

### 3.7.1 Isomerenreine Aufreinigung

Die Isomerenreinheit isolierter Fraktionen wurde anhand von Pulverdiffraktogrammen ermittelt. Die Auswertung erfolgte durch den Vergleich mit aus Kristallstrukturen berechneten Daten. Die Strukturen entsprachen den Einträgen CIVCAP01 ( $\alpha$ -TEPIC) und CIVCAP03 ( $\beta$ -TEPIC) der ICDD-Datenbank (The International Centre for Diffraction Data).

#### A. Umkristallisation<sup>[nach [347]]</sup>

Es wurden 9,1 g TEPIC mit 20 mL Methanol versetzt und unter Rühren und Rückfluss auf 70 °C erwärmt. Ungelöster Feststoff wurde abfiltriert. Beim langsamen Abkühlen des Filtrats fiel ein farbloser Feststoff aus. Dieser wurde abfiltriert und mit Methanol gewaschen, das unter vermindertem Druck entfernt wurde. Der Feststoff wurde unter vermindertem Druck bei 27 °C getrocknet. Es wurden 3,2 g TEPIC isoliert. Dieses wurde mit 35 mL Methanol für eine weitere Umkristallisation versetzt und unter Rückfluss und Rühren auf 70 °C erwärmt. Ungelöster Feststoff wurde abfiltriert. Der im Filtrat ausgefallene Feststoff wurde durch Erwärmen der Lösung auf 65 °C und Zugabe von 10 Vol.-% Chloroform wieder gelöst. Nach Abkühlen der Lösung wurde der ausgefallene Feststoff abfiltriert und mit Methanol gewaschen. Nach Trocknung unter vermindertem Druck wurden 2,3 g TEPIC isoliert. Dieses wurde analog mit 25 mL Methanol umkristallisiert. Hierauf wurden 1,4 g TEPIC isoliert. Es folgte ein vierter Umkristallisationsschritt. Schließlich konnten 0,6 g  $\alpha$ -TEPIC isoliert werden.

#### B. Chromatographische Aufreinigung<sup>[nach [348]]</sup>

Die chromatographische Aufreinigung erfolgte an der HPLC-Anlage Agilent Series 1200 mit der Säule Inertsil ODS-3 (5  $\mu$ m, 250  $\times$  4,6 mm). Die Detektionswellenlänge betrug 205 nm und das Injektionsvolumen 25  $\mu$ L. Es wurden zum einen die Eluenten A (Phosphorsäurelösung/Acetonitril (90/10 (v/v))) und B (Acetonitril/Wasser (50/50 (v/v))) eingesetzt. Die Flussrate betrug 0,2 mL min<sup>-1</sup>, wobei 10 min Eluent B, 5 min Eluent A, 12 min Eluent B. Für diese Messungen wurden jeweils TEPIC und durch Umkristallisation aufgereinigtes  $\alpha$ -TEPIC in Eluent A gelöst (ca. 100  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>). Außerdem wurde ein Wasser/Methanol-Gradient eingesetzt. Die Flussrate betrug 0,2 mL min<sup>-1</sup>, wobei 3 min 10 % Methanol, 10-90 % Methanol in 17 min, 7 min 90 % Methanol, 13 min 10 % Methanol. Für diese

Messungen wurden jeweils TEPIC und  $\alpha$ -TEPIC in Wasser (ca.  $100\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ ) bei  $90\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelöst. Die Elutionsvolumina der Signale bei 8,1 min, 13,6 min, 16,5 min und 27,9 min wurden fraktioniert und mittels HPLC-MS analysiert. Dazu wurden sie auf die Säule Phen ( $5\text{ }\mu\text{m}$ ,  $260 \times 3\text{ mm}$ , Vorsäule ( $10\text{ mm}$ )) injiziert. Der Fluss betrug  $0,4\text{ mL min}^{-1}$ . Der Gradient der Eluenten Wasser und Acetonitril entsprach 3 min 20 % Acetonitril, 20-90 % Acetonitril in 17 min, 10 min 90 % Acetonitril, 10 min 20 % Acetonitril.

### C. Selektives Lösen in Chloroform

Ca. 10 g TEPIC wurden mit 10 mL Chloroform versetzt. Der ungelöste Feststoff wurde abfiltriert und Chloroform unter vermindertem Druck entfernt. Der erhaltene farblose Feststoff wurde unter vermindertem Druck bei  $70\text{ }^{\circ}\text{C}$  getrocknet. Es konnten ca. 5 g  $\alpha$ -TEPIC isoliert werden.

## 3.7.2 Herstellung von Monolithkapillarsäulen

### A. Synthese mit variierendem Porogenanteil

Der Ansatz wurde mit 300 mg  $\alpha$ -TEPIC in Gewindegläschen ( $V = 2\text{ mL}$ ) hergestellt. Als Porogenmischung wurde 1,4-Dioxan/Isooctan (4:1) eingesetzt. Für die jeweiligen Volumenanteile setzte sich die Mischung wie folgt zusammen:

- 62 Vol.-%: 280  $\mu\text{L}$  1,4-Dioxan/70  $\mu\text{L}$  Isooctan,
- 65 Vol.-%: 320  $\mu\text{L}$  1,4-Dioxan/80  $\mu\text{L}$  Isooctan,
- 68 Vol.-%: 360  $\mu\text{L}$  1,4-Dioxan/90  $\mu\text{L}$  Isooctan.

Der Porogenmischung wurden 2  $\mu\text{L}$  Bortrifluorid-Tetrahydrofuran-Komplex als Katalysator hinzugefügt. Die Mischung wurde zum vorgelegten Monomer gegeben. Das mit einer Schraubkappe verschlossene Gewindegläschen wurde bei  $90\text{ }^{\circ}\text{C}$  mit 800 rpm geschüttelt bis  $\alpha$ -TEPIC vollständig gelöst war. Die Polymerisationslösung wurde mit einer Spritze (1 mL), versehen mit einer Kanüle ( $0,80 \times 40\text{ mm}$ ), aufgenommen und in eine vorgewärmte Edelstahlkapillare (ID  $500\text{ }\mu\text{m}$ , OD  $1/16''$ ) überführt. Dazu wurde ein Ende der Kapillare mit einem PTFE-Schlauch ( $0,5 \times 1,6\text{ mm}$ ) versehen. Als die Lösung austrat, wurde die Kapillare mit UHU patafix Klebepads verschlossen und senkrecht mit dem unverschlossenen Ende zuerst in die Bohrungen ( $1/16''$ ) eines Aluminiumheizblocks gegeben. Die Säulen wurden ca. 7 h bei  $90\text{ }^{\circ}\text{C}$  temperiert.

#### **B. Synthese mit 65 Vol.-% Porogenanteil**

Der Ansatz mit 65 Vol.-% Porogen 1,4-Dioxan/Isooctan (4:1) wurde, wie in Abschnitt 3.7.2 A beschrieben, hergestellt. Die Monolithkapillarsäulen wurden in Perfluorethylenpropylen-Schläuchen (ID 0,8 mm, OD  $\frac{1}{16}$ " ) (engl. *Fluorinated Ethylene Propylene*, FEP) hergestellt. Die Lösung wurde entweder mit einer Spritze (1 mL), versehen mit einer Kanüle (0,80 × 40 mm), eingespritzt oder angesogen. Für das Ansaugen der Lösung waren der Schlauch und eine Kanüle während des Lösens von  $\alpha$ -TEPIC durch das Septum der Schraubkappe gestochen. Anschließend wurde der Schlauch in die Lösung getaucht und die Lösung angesogen. Der Schlauch wurde, noch mit der Spritze versehen, aus der Lösung gezogen und ggf. mit einem Eisennagel (0,8 × 11 mm) am unteren Ende verschlossen. Dann wurde die Spritze entfernt und der Schlauch auch an diesem Ende mit einem Nagel verschlossen. Die Schläuche wurden entweder unverschlossen oder verschlossen mit Eisennägeln waagrecht in Nuten ( $\frac{1}{16}$ " ) eines Aluminiumheizblocks gegeben und ca. 7 h bei 90 °C temperiert.

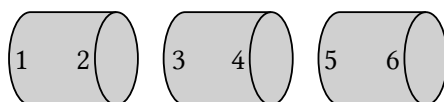
#### **C. Optimierte Befüllungstechnik**

Der Ansatz für die Herstellung einer Monolithkapillare mit 65 Vol.-% Porogen 1,4-Dioxan/Isooctan (4:1) in einem FEP-Schlauch (ID 0,8 mm, OD  $\frac{1}{16}$ " ) wurde, wie in Abschnitt 3.7.2 A beschrieben, hergestellt. Während des Lösens von  $\alpha$ -TEPIC wurde der Schlauch durch das Septum der Schraubkappe gestochen, ohne in die Lösung einzutauchen. Nach vollständigem Lösen von  $\alpha$ -TEPIC wurde der Schlauch in die Lösung getaucht und eine Spritze (5 mL), die mit Luft aufgezogen war, ebenfalls in das Septum gestochen, ohne in die Lösung einzutauchen. Die Luft wurde langsam eingespritzt. Als die Lösung aus dem Schlauch austrat, wurde dieser mit einem Eisennagel (0,8 × 11 mm) verschlossen, aus dem Septum gezogen und auch am anderen Ende mit einem Nagel verschlossen.

### **3.7.3 Analytik**

#### **A. Morphologievisualisierung mittels Environmental Scanning Electron Microscope (ESEM)**

Monolithkapillarsäulen in Edelstahlkapillaren wurden mit einem Kappgerät und Kapillarsäulen in FEP-Schläuchen mit einem Kapillarschneider zerteilt. Die Säulenstücke wurden bei 90 °C getrocknet. Die Nummerierung der Querschnitte erfolgte wie in Abbildung 3.1 angegeben.



**Abbildung 3.1.** Nummerierung der Säulenquerschnitte für die Morphologievisualisierung mittels Environmental Scanning Electron Microscope (ESEM).

## B. Porosimetrie

Für Porosimetrieuntersuchungen wurden Monolithkapillaren mit isoliertem  $\alpha$ -TEPIC als Monomer und 65 Vol.-% Porogen bestehend aus Isooctan und 1,4-Dioxan in FEP-Schläuchen (ID 0,8 mm) analog der Beschreibung in Abschnitt 3.7.2 C hergestellt. Die Kapillaren wurden bei 95 °C getrocknet und aus dem Schlauch herausgedrückt. Sie wurden mit einer Klinge in kleine Stücke zerteilt. Für die Messungen wurden ca. 120 mg eingesetzt. Der Druckbereich für die Quecksilber-Intrusionsporosimetrie betrug 0,0007–410 MPa. Für die Auswertung wurden nur die Daten bis 10 MPa berücksichtigt. Die Messunsicherheiten wurden nach einer von Dr. Peter Klobes (Fachbereich 1.3 Strukturanalytik der BAM Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung) entwickelten Berechnung ermittelt. Dabei wurden die Unsicherheiten für die spezifische Oberfläche mit 2,8 % und die für die Porengröße mit 2,0 % festgelegt. Gasadsorptionsmessungen erfolgten mit Stickstoff (77 K) und Krypton (77 K).

## 3.8 Monolithsynthese mit GE 500, GE 100 und Monomergemischen

### 3.8.1 Monolithsynthesen

Das Monomer bzw. die Monomermischung wurde in einem Gewindegläschen ( $V = 2$  mL) vorgelegt. Dem Porogen wurden 12,5  $\mu$ L Bortrifluoridetherat (1,25 Vol.-%, 1:10 in 1,4-Dioxan) für einen Ansatz mit  $V = 1$  mL und 6,25  $\mu$ L Bortrifluoridetherat (1,25 Vol.-%, 1:10 in 1,4-Dioxan) für einen Ansatz mit  $V = 0,5$  mL als Katalysator hinzugefügt. Die Porogen/Katalysator-Mischung wurde zum Monomer gegeben. Das Gewindegläschen wurde mit einer Schraubkappe verschlossen und der Reaktionsansatz sofort mit einem Vortexmischer mindestens eine Minute, bis die Lösung homogen war, mit 2500 rpm durchmischt. Der Ansatz wurde anschließend bei Raumtemperatur, ohne ihn zu bewegen, stehen gelassen bis die Polymerisation beendet war.

**A. Porogenscreening für Synthesen mit GE 100 und GE 500**

Die Monolithsynthesen wurden mit einem Gesamtvolumen von 1 mL durchgeführt. Als Porogene wurden die Mischungen Toluol/MTBE (3:2), 1,4-Dioxan/Toluol (1:4) und 1,4-Dioxan/MTBE (2:3) mit den Anteilen 40, 60 und 80 Vol.-% eingesetzt. Die Mischungsverhältnisse sind in Tabelle 3.6 zusammengestellt.

**Tabelle 3.6.** Mischungsverhältnisse für V = 1 mL der Monomere GE 100 und GE 500 mit drei Porogenmischungen zusammengesetzt aus 1,4-Dioxan (Dioxan), Methyl-*tert*-butylether (MTBE) und Toluol mit unterschiedlichen Volumenanteilen.

Porogenanteil [Vol.-%]	m(GE 500) [mg]	m(GE 100) [mg]	V(Dioxan) [μL]	V(MTBE) [μL]	V(Toluol) [μL]
Toluol/MTBE (3:2)					
40	738	732	-	160	240
60	492	488	-	240	360
80	246	244	-	320	480
Dioxan/Toluol (1:4)					
40	738	732	80	-	320
60	492	488	120	-	480
80	246	244	160	-	640
Dioxan/MTBE (2:3)					
40	738	732	160	240	-
60	492	488	240	360	-
80	246	244	320	480	-

**B. 1,4-Dioxan oder Methyl-*tert*-butylether als Porogen für Synthesen mit GE 500**

Die Monolithsynthesen wurden mit einem Gesamtvolumen von 0,5 mL durchgeführt. Es wurden 1,4-Dioxan oder MTBE als Porogen eingesetzt. Der Porogenanteil wurde von 10 auf 90 Vol.-% in fünf Prozentschritten erhöht. Die Mischungsverhältnisse sind in Tabelle 3.7 zusammengestellt.

**Tabelle 3.7.** Mischungsverhältnisse für  $V = 0,5$  mL von Monomer GE 500 mit variierenden Volumenanteilen der Porogene 1,4-Dioxan bzw. Methyl-*tert*-butylether (MTBE).

Porogenanteil [Vol.-%]	V(Porogen) [ $\mu$ L]	V(GE 500) [ $\mu$ L]	m(GE 500) [mg]
10	50	450	554
15	75	425	523
20	100	400	492
25	125	375	461
30	150	350	431
35	175	325	400
40	200	300	369
45	225	275	338
50	250	250	308
55	275	225	277
60	300	200	246
65	325	175	215
70	350	150	185
75	375	125	154
80	400	100	123
85	425	75	92
90	450	50	62



**C. Variation des Porogenvolumenanteils für Synthesen mit GE 500**

Die Monolithsynthesen wurden mit einem Gesamtvolumen von 1 mL durchgeführt. Der Anteil der Porogenmischung 1,4-Dioxan/MTBE (2:3) wurde von 40 bis 80 Vol.-% variiert. Die Mischungsverhältnisse sind in Tabelle 3.8 zusammengestellt.

**Tabelle 3.8.** Mischungsverhältnisse für V = 1 mL von Monomer GE 500 mit variierenden Volumenanteilen der Porogenmischung 1,4-Dioxan/Methyl-*tert*-butylether (MTBE) (2:3).

Porogenanteil [Vol.-%]	V(GE 500) [μL]	m(GE 500) [mg]	V(1,4-Dioxan) [μL]	V(MTBE) [μL]
40	600	738	160	240
50	500	615	200	300
55	450	554	220	330
60	400	492	240	360
70	300	369	280	420
71	290	357	284	426
72	280	344	288	432
73	270	332	292	438
74	260	320	296	444
75	250	308	300	450
76	240	295	304	456
77	230	283	308	462
78	220	271	312	468
79	210	258	316	474
80	200	246	320	480

**D. Synthesen mit Monomergemischen**

Die Monolithsynthesen wurden mit einem Gesamtvolumen von 1 mL durchgeführt. Die Monomermischung setzte sich aus GE 500 und BDG, EDG oder BDE als Comonomer zusammen. Der Anteil des jeweiligen Comonomers wurde am Gesamtmonomeranteil (25 Vol.-%) in fünf Prozentschritten von 5-100 % erhöht. Die Mengenverhältnisse sind in Tabelle 3.9 zusammengestellt. Die Porogenmischung (75 Vol.-%) setzte sich aus 300  $\mu$ L 1,4-Dioxan und 450  $\mu$ L MTBE zusammen.

**Tabelle 3.9.** Monomermischungsverhältnisse für V = 1 mL von GE 500 mit 1,4-Butandiol diglycidylether (BDG), Ethylenglycoldiglycidylether (EDG) oder 1,3-Butadiendiepoxid (BDE) in Abhängigkeit des Diepoxidanteils am Gesamtmonomeranteil von 25 Vol.-%.

Anteil [%]	V(GE 500) [ $\mu$ L]	m(GE 500) [mg]	V(Diepoxid) [ $\mu$ L]	m(BDG) [mg]	m(EDG) [mg]	m(BDE) [mg]
5	238	292	13	14	15	14
10	225	277	25	28	30	28
15	213	261	38	41	45	42
20	200	246	50	55	60	56
25	188	231	63	69	74	70
30	175	215	75	83	89	84
35	163	200	88	96	104	97
40	150	185	100	110	119	111
45	138	169	113	124	134	125
50	125	154	125	138	149	139
55	113	138	138	151	164	153
60	100	123	150	165	179	167
65	88	108	163	179	193	181
70	75	92	175	193	208	195
75	63	77	188	206	223	209
80	50	62	200	220	238	223
85	38	46	213	234	253	237
90	25	31	225	248	268	250
95	13	15	238	261	283	264
100	0	0	250	275	298	278

## 3.8.2 Analytik

### A. Titration der Monomere

#### Ringöffnung durch Hydrochlorierung<sup>[nach [349]]</sup>

Die Monomere GE 500, BDG, EDG und BDE ( $m$  in [g]) wurden jeweils mit gleichen Volumina an Salzsäure (0,1 M,  $c_{HCl}$ ) ( $V_{HCl}$  in [mL]) und 1,4-Dioxan versetzt. Die eingesetzten Mengen sind in Tabelle 3.10 angegeben. Die Lösung wurde 3 h bei 80 °C unter Rühren in einem Wasserbad temperiert. Anschließend wurden nach Abkühlung der Lösung fünf Tropfen Phenolphthalein als Indikator dazugegeben. Die Lösung wurde mit NaOH (0,1 M,  $c_{NaOH}$ ) titriert ( $V_{NaOH}$  in [mL]) bis sie sich schwach pink verfärbte. Der Epoxidwert (EN in [äq./100 g]) wurde nach folgender Formel berechnet:

$$EN = \frac{V_{HCl} \cdot c_{HCl} - V_{NaOH} \cdot c_{NaOH}}{m} \cdot 0,1. \quad (3.1)$$

Der angegebene Epoxidgehalt eines Monomers entspricht dem Mittelwert einer Dreifachbestimmung.

**Tabelle 3.10.** Mengen eingesetzter Reagenzien für die Hydrochlorierung der Monomere GE 500, 1,4-Butandiol diglycidylether (BDG), Ethylenglycoldiglycidylether (EDG) und 1,3-Butadiendiepid (BDE).

	Monomer			Salzsäure		1,4-Dioxan
	V [μL]	m [mg]	n [mmol]	V [mL]	n [mmol]	V [mL]
GE 500	407	500	-	30	3,0	30
BDG	100	110	1,1	15	1,5	15
EDG	100	119	1,4	20	2,0	20
BDE	100	113	2,6	30	3,0	30

#### Ringöffnung mit Natriumsulfit<sup>[nach [229]]</sup>

Es wurde eine gesättigte Natriumsulfitlösung hergestellt, die filtriert und auf pH 9,5, dem Umschlagpunkt des Indikators, eingestellt wurde. Die pH Werte von GE 500, BDG, EDG und BDE wurden vor der Titration auf Neutralität überprüft. Es wurden 1,0 g GE 500, 1,839 mL BDG (0,01 mol, 2,023 g), 1,464 mL EDG (0,01 mol, 1,742 g) und 0,762 mL BDE (0,01 mol, 0,861 g) ( $m$  in [g]) mit je 50 mL der gesättigten Natriumsulfitlösung und 6 Tropfen Indikatorlösung (vgl. Abschnitt 3.2 auf Seite 47) versetzt. Die Lösung wurde bei Raumtemperatur 3 h gerührt. Anschließend wurden die generierten Natronlaugeäquivalente mit Salzsäure (0,2 M,  $c_{HCl}$ ) titriert ( $V_{HCl}$  in [mL]) bis sich die braun gefärbte Lösung

türkis färbte und der pH-Wert, der mit einem pH-Meter verfolgt wurde, 9,5 betrug. Der Epoxidwert (EN in [äq./100 g]) wurde nach folgender Formel berechnet:

$$EN = \frac{V_{HCl} \cdot c_{HCl}}{m} \cdot 0,1. \quad (3.2)$$

Der angegebene Epoxidgehalt eines Monomers entspricht dem Mittelwert einer Dreifachbestimmung.

### B. Kernspinresonanzspektren (NMR)

Die Messungen von BDG, EDG und BDE wurden an dem Gerät DMX 400 durchgeführt. Zur Zuordnung von H,H-Kopplungen wurden von BDG und EDG zusätzlich H,H-COSY-Spektren aufgenommen. Die Messung von GE 100 in CDCl<sub>3</sub> bei 500 MHz erfolgte mit dem Gerät AVANCE III 500.

<sup>1</sup>H-NMR von 1,3-Butadiendiepoxyd (DMSO-d<sup>6</sup>, 400 MHz) δ [ppm]: 2,84-2,77 (m, 4 H); 2,74-2,69 (m, 2 H).

<sup>1</sup>H-NMR von Ethylenglycoldiglycidylether (DMSO-d<sup>6</sup>, 400 MHz) δ [ppm]: 3,71 (dd, 2 H, *J* = 2,8 Hz, 11,6 Hz); 3,57-3,50 (m, 4 H); 3,27 (dd, 2 H, *J* = 6,4 Hz, 11,6 Hz); 3,11-3,06 (m, 2 H); 2,72 (dd, 2 H, *J* = 4,2 Hz, 5,1 Hz); 2,54 (dd, 2 H, *J* = 2,7 Hz, 5,1 Hz).

<sup>1</sup>H-NMR von 1,4-Butandiol diglycidylether (DMSO-d<sup>6</sup>, 400 MHz) δ [ppm]: 3,66 (dd, 2 H, *J* = 2,8 Hz, 11,6 Hz); 3,47-3,38 (m, 4 H); 3,23 (dd, 2 H, *J* = 6,3 Hz, 11,6 Hz); 3,11-3,05 (m, 2 H); 2,71 (dd, 2 H, *J* = 4,2 Hz, 5,1 Hz); 2,53 (dd, 2 H, *J* = 2,7 Hz, 5,2 Hz); 1,60-1,49 (m, 4 H).

### C. Morphologievisualisierung mittels Environmental Scanning Electron Microscope (ESEM)

Die Monolithblöcke (vgl. Synthesen Abschnitt 3.8.1 A + C + D ab Seite 64) wurden mit einer Klinge in drei Scheiben geschnitten und bei 90 °C getrocknet. Mikroskopiert wurde die mittlere Scheibe.

### D. Porosimetrieuntersuchung mittels Quecksilber-Intrusionsporosimetrie

Die Monolithblöcke wurden, wie in den Abschnitten 3.8.1 C + D ab Seite 64 beschrieben, in Gewindegläsern (V = 2 mL) mit einem Gesamtvolumen von 1 mL hergestellt. Nach der Polymerisation wurden die Monolithblöcke im Gewindegläsern bei 90 °C getrocknet. Anschließend wurde das Gewindegläsern vorsichtig mit einem Hammer zerkleinert und die Splitter wurden vom Monolithblock entfernt. Die Blöcke wurden mit

einer Klinge in Scheiben geschnitten und nochmals bei 90 °C getrocknet. Durchschnittlich wurden für die Messungen ca. 350-400 mg Material verwendet. Der Druckbereich für die Messungen der Monolithe, die mit GE 500 hergestellt wurden, betrug 0,0007-200 MPa und für die, die mit Monomergemischen hergestellt wurden, 0,005-200 MPa. Die Messunsicherheiten wurden nach einer von Dr. Peter Klobes Fachbereich 1.3 Strukturanalytik der BAM Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung) entwickelten Berechnung ermittelt. Dabei wurden die Unsicherheiten für die spezifische Oberfläche mit 2,8 % und die für die Porengröße mit 2,0 % festgelegt.

#### **E. Härtebestimmung nach SHORE A**

Die Monolithblöcke wurden, wie in den Abschnitt 3.8.1 C + D ab Seite 64 beschrieben, in Gewindegläsern ( $V = 20 \text{ mL}$ ,  $\varnothing 27,5 \text{ mm}$ ) mit einem Gesamtvolumen von 15 mL hergestellt. Die Mischungsverhältnisse für Ansätze mit GE 500 und unterschiedlichen Porogenvolumenanteilen sind in Tabelle 3.11 angegeben und die Verhältnisse für die Monomermischungen in Tabelle 3.12 zusammengestellt. Der Porogenmischung wurden als Katalysator 187,5  $\mu\text{L}$  Bortrifluoridetherat (1,25 Vol.-%, 1:10 in 1,4-Dioxan) hinzugefügt. Die Porogenmischung (75 Vol.-%) für die Synthese mit Monomergemischen setzte sich aus 4,50 mL 1,4-Dioxan und 6,75 mL MTBE zusammen. Nach der Polymerisation wurden die Gewindegläser in ein Wasserbad gegeben, um den Hauptteil des Porogens zu verdampfen. Das Wasserbad wurde langsam auf 90 °C erhitzt, damit kein Druck im Monolith durch verdampfendes Porogen entstand. Anschließend wurden die Monolithblöcke unter vermindertem Druck bei 40 °C getrocknet. Danach wurde das Gewindegläschen mit einem Hammer vorsichtig zerkleinert und Splitter wurden vom Monolithblock entfernt, der in 6-8 mm dicke Scheiben zersägt wurde. Die Scheiben wurden nochmals unter vermindertem Druck bei 40 °C getrocknet. Die Härtebestimmung wurde mit einem Durometer durchgeführt. Die Messungen wurden mit mehreren Scheiben eines Ansatzes und an unterschiedlichen Stellen auf einer Scheibe durchgeführt. Die angegebenen Werte entsprechen dem Median einer Messreihe.

**Tabelle 3.11.** Mischungsverhältnisse für  $V = 15 \text{ mL}$  von Monomer GE 500 mit unterschiedlichen Volumenanteilen der Porogenmischung 1,4-Dioxan/Methyl-*tert*-butylether (MTBE) (2:3) für die Härtebestimmung nach SHORE A.

Porogenanteil [%]	V(GE 500) [ $\mu\text{L}$ ]	m(GE 500) [g]	V(1,4-Dioxan) [ $\mu\text{L}$ ]	V(MTBE) [ $\mu\text{L}$ ]
60	6000	7,380	3600	5400
70	4500	5,535	4200	6300
75	3750	4,613	4500	6750
80	3000	3,690	4800	7200

**Tabelle 3.12.** Monomermischungsverhältnisse für  $V = 15 \text{ mL}$  von GE 500 mit 1,4-Butandiol diglycidylether (BDG), Ethylenglycoldiglycidylether (EDG) oder 1,3-Butadiendiepoxid (BDE) in Abhängigkeit des Diepoxidanteils am Gesamtmonomeranteil von 25 Vol.-% für die Härtebestimmung nach SHORE A.

Anteil [%]	V(GE 500) [ $\mu\text{L}$ ]	m(GE 500) [g]	V(Diepoxid) [ $\mu\text{L}$ ]	m(BDG) [g]	m(EDG) [g]	m(BDE) [g]
10	3375	4,151	375	0,413	0,446	0,417
20	3000	3,690	750	0,825	0,893	0,835
25	2813	3,459	938	1,031	-	-
30	2625	3,229	1125	1,238	1,339	1,252
35	2438	2,998	1313	-	-	1,461
40	2250	2,768	1500	-	1,785	1,670
50	1875	2,306	1875	-	-	2,087
60	1500	1,845	2250	-	-	2,504

### 3.8.3 Herstellung und Anwendung monolithischer Phasen

#### A. Monolithkapillarsäulen mit GE 500

##### Silanisierung

Die Edelstahlkapillare ( $80 \times 0,5$  mm, OD  $1/16''$ ) wurde zunächst mit (3-Aminopropyl)trimethoxysilan silanisiert. Dazu wurde sie 30 min in Natronlauge (20 Gew.-%) gereinigt und danach mit Methanol gewaschen. Die Kapillare wurde 30 min bei Raumtemperatur in eine methanolische APTMS-Lösung gegeben. Abschließend wurde sie erneut gewaschen und getrocknet.

##### Herstellung der Monolithkapillarsäule

Die Polymerisationsmischung ( $V = 1$  mL) wurde mit 75 Vol.-% Porogenanteil angesetzt. Als Porogen/Katalysator-Mischung wurden 450  $\mu$ L MTBE und 300  $\mu$ L 1,4-Dioxan mit 12,5  $\mu$ L Bortrifluoridetherat (1,25 Vol.-%, 1:10 in 1,4-Dioxan) gemischt. Es wurden 308 mg GE 500 (250  $\mu$ L) in einem Gewindegläschen ( $V = 2$  mL) vorgelegt, zu denen die hergestellte Mischung gegeben wurde. Das Gewindegläschen wurde mit einer Schraubkappe verschlossen und der Reaktionsansatz sofort mit einem Vortexmischer mindestens eine Minute, bis die Lösung homogen war, mit 2500 rpm durchmischt. Die Kapillarsäule wurde an beiden Enden mit einem Anschlussstück versehen und durch das Septum der Schraubkappe gestochen. Sie füllte sich ohne äußere Druckeinwirkung mit der Polymerisationsmischung. Sobald die Lösung am oberen Ende austrat, wurde das Ende mit einem Anschlussstück und einer Kappe verschraubt. Die Kapillare wurde aus der Lösung gezogen. Das untere Ende wurde gereinigt und ebenfalls verschraubt. Die Säule wurde während der Polymerisation bei Raumtemperatur senkrecht gelagert. Nach der Polymerisation wurde sie mit einem Kappgerät auf ca. 60 mm gekürzt, bis der Monolith an beiden Enden zu erkennen war.

##### Funktionalisierung mit rekombinantem Protein A

Die Monolithkapillarsäule ( $60 \times 0,5$  mm, OD  $1/16''$ , 12  $\mu$ L) wurde mit  $0,5 \text{ mL min}^{-1}$  für 10 min mit jeweils Methanol/Wasser (50/50 (v/v)), Wasser und Carbonatpuffer (pH 9,6) an der HPLC-Anlage UltiMate® 3000 gewaschen. Danach wurde sie für 2 h bei Raumtemperatur mit Carbonatpuffer (pH 9,6) gefüllt und verschlossen. Im Anschluss wurde die Kapillare an beiden Enden mit Inline-Solvent-Filtern versehen. Es wurden 50  $\mu$ L einer Lösung von rekombinantem Protein A ( $10 \text{ mg mL}^{-1}$  in Carbonatpuffer (pH 9,6)) manuell mit einer Glasspritze injiziert. Die Kanüle wurde mit einem PTFE-Schlauch ( $0,5 \times 1,6$  mm)

verstärkt, sodass sie mittels Anschlussstück mit dem Filter verschraubt werden konnte. Am anderen Ende wurde ebenfalls eine Glasspritze verschraubt. Die Lösung wurde langsam in die Monolithkapillare gedrückt. Der Stempel der zweiten Spritze wurde dabei herausgedrückt, sodass gesichert war, dass die Lösung des rekombinanten Protein A in die Kapillare überführt wurde. Sie wurde dann mit Anschlussstücken und Kappen an beiden Enden verschlossen und bei 30 °C für 18 h gelagert. Unfunktionalisierte Epoxidgruppen wurden mit 0,1 mL min<sup>-1</sup> Tris (10 mM, pH 8,5) für 1 h geblockt. Danach wurde die Monolithkapillare mit PBS (pH 7,6) gewaschen.

### **Affinitätsexperiment**

Es wurden 100 µL Kaninchenserum (1:10 in PBS (pH 7,6)) manuell mit einer Glasspritze auf die Monolithkapillare injiziert. Die Glasspritze war mit einem PTFE-Schlauch (0,5 × 1,6 mm) versehen. Somit konnte die Spritze mittels Anschlussstück verschraubt werden. Die Kapillare wurde hierauf an beiden Enden mit Inline-Solvent-Filtern versehen und mit Anschlussstücken an die HPLC-Anlage UltiMate® 3000 angeschlossen. Sie wurde mit 0,4 mL min<sup>-1</sup> PBS (pH 7,6) für 7 min gewaschen. Es folgte der Elutionsschritt mit 0,4 mL min<sup>-1</sup> Glycin-HCl-Lösung (pH 2,2) für 3 min. Im Anschluss wurde die Kapillare erneut mit 0,4 mL min<sup>-1</sup> PBS für 5 min gewaschen. Die Detektionswellenlänge betrug 280 nm. Nach den Experimenten wurde die Kapillare mit PBS (pH 7,6, 0,1 Gew.-% Natriumazid) gewaschen und bei 4 °C gelagert. Die Integration des Elutionssignals erfolgte automatisch mit der Gerätesoftware. Es wurden jeweils fünf Messungen durchgeführt.

### **Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)**

Das Experiment wurde in einer Mikrotiterplatte (Microton 600, high binding) bei Raumtemperatur durchgeführt. Während der Inkubationsschritte wurde die Mikrotiterplatte mit einem Mikrotiterplatten-Schüttler bei 750 rpm geschüttelt. Die Kavitäten wurden während jedes Waschschriffs dreimal mit Hilfe eines Mikrotiterplatten-Waschautomaten mit PBS-T gewaschen. Das Elutionsvolumen (7-15 min) wurde tropfenweise in Intervallen von ca. 0,3 s in einer Mikrotiterplatte aufgefangen. Jede Fraktion wurde 1:200 mit PBS (pH 7,6) verdünnt. 200 µL dieser Verdünnung wurden in eine neue Mikrotiterplatte überführt und für 5,5 h inkubiert. Nach einem Waschschrift wurden zu jeder Kavität 200 µL einer Caseinlösung (0,2 % (w/v) in PBS (pH 7,6)) gegeben und für 1 h inkubiert. Nach einem erneuten Waschschrift wurden in jede Kavität 200 µL einer Anti-Kaninchen-IgG-Peroxidase-Konjugat-Lösung (0,02 µg mL<sup>-1</sup> in PBS (pH 7,6)) pipettiert. Nach einer einstündigen Inkubationszeit folgte ein weiterer Waschschrift. Schließlich wurden in jede Kavität 200 µL Substratlösung gegeben. Die Reaktion wurde nach 30 min durch Zugabe



von 50  $\mu\text{L}$  Schwefelsäure (1 M) gestoppt. Das Farbsignal wurde photometrisch mit einem Mikrotiterplatten-Spektrophotometer SpectraMax Plus<sup>384</sup> bei 450 nm gemessen. Als Referenz wurde die Absorption auf 620 nm bezogen.

#### **Messung von Immunglobulin G (IgG) mit Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization (MALDI)**

Es wurden 5  $\mu\text{L}$  Anti-Kaninchen-IgG und 5  $\mu\text{L}$  TFA-Lösung (0,025 Vol.-%) in Zeba Spin Desalting Columns 2 min bei Raumtemperatur mit  $1000 \times g$  zentrifugiert. Anschließend wurden 0,5  $\mu\text{L}$  der unverdünnten IgG-Lösung mit 0,5  $\mu\text{L}$  Matrix auf dem Target aufgetragen. Die Messung des fraktionierten Elutionsvolumens (7-10 min) erfolgte analog.

### **B. Monolithdisks mit GE 500**

#### **Herstellung der Monolithdisk**

Es wurden Monolithdisks mit 70 und 75 Vol.-% Porogen ( $V = 1 \text{ mL}$ ) in Inline-Solvent-Filtern hergestellt. Es wurden 369 mg (300  $\mu\text{L}$ , 30 Vol.-%) bzw. 308 mg (250  $\mu\text{L}$ , 25 Vol.-%) GE 500 in einem Gewindegläschen ( $V = 2 \text{ mL}$ ) vorgelegt. Den Porogenmischungen, bestehend aus 280  $\mu\text{L}$  1,4-Dioxan und 420  $\mu\text{L}$  MTBE (70 Vol.-%) bzw. 300  $\mu\text{L}$  1,4-Dioxan und 450  $\mu\text{L}$  MTBE (75 Vol.-%), wurden 12,5  $\mu\text{L}$  Bortrifluoridetherat (1,25 Vol.-%, 1:10 in 1,4-Dioxan) als Katalysator hinzugefügt. Die Porogen/Katalysatormischung wurde zum Monomer gegeben und die mit einer Schraubkappe verschlossenen Gewindegläschen wurden sofort mit einem Vortexmischer mit 2500 rpm mindestens 1 min, bis die Lösung homogen war, durchmischt. Es wurden ca. 750  $\mu\text{L}$  der Polymerisationslösung mit einer Spritze (1 mL), versehen mit einer Kanüle (1,60  $\times$  40 mm), aufgenommen. Die Kanüle wurde mittels Anschlussstück mit dem Inline-Solvent-Filter verschraubt. Am unteren Ende des Filters wurde eine Edelstahlkapillare (OD  $1/16''$ ) mit einem Anschlussstück verschraubt. Sichtbare Blasen wurden herausgeklopft. Die Lösung wurde langsam in den Filter gedrückt bis sie am Kapillarende austrat. Daraufhin wurde dieses mit einer Kappe und einem Anschlussstück verschlossen. Die Apparatur blieb so bei Raumtemperatur stehen, bis die Polymerisation beendet war. Das Eintreten der Phasenseparation nach ca. 2 h konnte anhand der in der Spritze verbliebenen Lösung verfolgt werden. Die Monolithdisks wurden im Filter mit Hilfe einer Spritze (5 mL) und einer Kanüle (1,60  $\times$  40 mm), die mit dem Filter mittels Anschlussstück verschraubt wurde, mit 20 mL DMSO und 60 mL Wasser manuell gewaschen. Danach wurden sie bei 60 °C getrocknet. Die Disks ließen sich mit Druckluft leicht aus dem Filter entfernen. Sie wurden bei Raumtemperatur in 1,4-Dioxan gelagert.

### **Funktionalisierung mit rekombinantem Protein A**

Die Monolithdisks ( $7 \times 2$  mm, 77  $\mu$ L), hergestellt mit 70 und 75 Vol.-% Porogen, wurden in einen Inline-Solvent-Filter gegeben und mit 30 mL Wasser manuell gewaschen und anschließend mit Druckluft wieder aus dem Filter entfernt. Die Disks wurden jeweils mittels der Epoxid-Methode bei pH 8 und 11 als auch mittels SCHIFFScher-Base-Methode funktionalisiert. Für die Funktionalisierung mittels Epoxid-Methode wurden die Disks in eine Lösung von rekombinantem Protein A ( $5 \text{ mg mL}^{-1}$  in Carbonatpuffer (pH 8 bzw. 11)) gegeben und 8 Tage bei  $30^\circ\text{C}$  mit 300 rpm geschüttelt. Für die Funktionalisierung mittels SCHIFFScher-Base-Methode wurden die Monolithdisks in Schwefelsäure (0,5 M) gegeben und bei  $60^\circ\text{C}$  für 4 h temperiert. Anschließend wurden sie im Filter manuell mit 20 mL Wasser gewaschen. Danach wurden die Disks in Periodsäure (219 mM in Essigsäure/Wasser (90/10 (v/v))) gegeben und für 4 h bei  $30^\circ\text{C}$  mit 300 rpm geschüttelt. Anschließend folgte wieder ein manueller Waschschriff mit Wasser bis zur Neutralität der Waschlösung. Schließlich wurden die Disks in eine Lösung von rekombinantem Protein A (PBS (pH 6)) mit Natriumcyanoborhydrid (111 mM) gegeben und bei Raumtemperatur für 8 Tage gelagert. Die mittels der Epoxid-Methode funktionalisierten Disks wurden nach der Funktionalisierung im Filter mit Tris (200 mM, pH 8,5) gewaschen und in Tris für 2 h bei  $30^\circ\text{C}$  mit 300 rpm geschüttelt. Die Disks, die mittels SCHIFFScher-Base-Methode funktionalisiert wurden, wurden in eine Natriumborhydrid-Lösung (66 mM in PBS (pH 8)) für 2 h bei  $30^\circ\text{C}$  gegeben. Alle Disks wurden anschließend mit  $1 \text{ mL min}^{-1}$  PBS (pH 7,6) an der HPLC-Anlage Agilent Series 1200 gewaschen.

### **Affinitätsexperiment**

Es wurde 1 mL Kaninchenserum (1:2 in PBS (pH 7,6)) manuell mit einer Spritze (1 mL), versehen mit einer Kanüle ( $1,60 \times 40$  mm), die mittels Anschlussstück mit dem Inline-Solvent-Filter verschraubt wurde, injiziert. Die Disks wurden hierauf an die HPLC-Anlage Agilent Series 1200 mit Anschlussstücken angeschlossen. Davor und dahinter wurden jeweils Inline-Solvent-Filter mit einer Fritte ( $20 \mu\text{m}$ ) geschaltet, um zu vermeiden, dass Partikel in die Anlage gerieten. Sie wurden mit  $2,0 \text{ mL min}^{-1}$  für 7 bzw. 5 min mit PBS (pH 7,6) gewaschen. Es folgte der Elutionsschritt mit  $2,0 \text{ mL min}^{-1}$  für 5 bzw. 3 min mit Glycin-HCl-Lösung (pH 2,2). Im Anschluss wurden die Disks erneut mit  $2,0 \text{ mL min}^{-1}$  für 5 min mit PBS gewaschen. Die Detektionswellenlänge betrug 280 nm. Nach den Experimenten wurden die Monolithdisks mit PBS (pH 7,6, 0,1 Gew.-% Natriumazid) gewaschen und bei  $4^\circ\text{C}$  gelagert. Die Integration des Elutionssignals erfolgte mit der Gerätesoftware. Die Integrationsgrenzen waren der Elutionsbeginn (7 bzw. 5 min) und das Elutionsende (12 bzw. 8 min). Es wurden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt.

### **C. Monolithdisks mit GE 500 und 1,3-Butadiendiepoxid (BDE)**

#### **Herstellung der Monolithdisk**

Die Synthese wurde, wie in Abschnitt 3.8.3 B beschrieben, durchgeführt. Die Mischung setzte sich aus 123 mg GE 500 (100  $\mu\text{L}$ ) und 167 mg BDE (150  $\mu\text{L}$ , 60 %) als Monomere und 75 Vol.-% der Porogenmischung 300  $\mu\text{L}$  1,4-Dioxan, 450  $\mu\text{L}$  MTBE mit 12,5  $\mu\text{L}$  Bortrifluoridetherat (1,25 Vol.-%, 1:10 in 1,4-Dioxan) zusammen.

#### **Funktionalisierung mit rekombinantem Protein A**

Die Monolithdisk ( $7 \times 2 \text{ mm}$ , 77  $\mu\text{L}$ ) wurde mittels SCHIFFScher-Base-Methode funktionalisiert. Dazu wurde sie im Inline-Solvent-Filter haftend für 4 h bei 60 °C in Schwefelsäure (0,5 M) gelegt. Anschließend wurde der Filter mit einem Ende an die HPLC-Anlage Agilent 1200 Series angeschlossen und die Disk solange mit 3  $\text{mL min}^{-1}$  Wasser gewaschen bis der pH-Wert neutral war. Daraufhin wurden mit Hilfe einer Spritzenpumpe 6 mL einer wässrigen Natriumperiodat-Lösung (0,2 M) mit 0,1  $\text{mL min}^{-1}$  durchgepumpt. Nach erneutem Waschen der Disk an der HPLC-Anlage mit 3  $\text{mL min}^{-1}$  Wasser für 20 min wurde sie im Luftstrom getrocknet. Schließlich wurde sie nach Entfernung aus dem Filter in 1 mL eine Lösung von rekombinantem Protein A (5  $\text{mg mL}^{-1}$  in Carbonatpuffer (pH 11,0)) mit Natriumcyanoborhydrid (80 mM) für 6 Tage bei Raumtemperatur gegeben. Danach wurde die Monolithdisk erneut mit 1  $\text{mL min}^{-1}$  Wasser für 20 min an der HPLC-Anlage gewaschen. Abschließend wurden 35 mL einer Natriumborhydrid-Lösung (26 mM, in PBS (pH 8)) mittels einer Spritzenpumpe mit 0,3  $\text{mL min}^{-1}$  durchgepumpt. Die Disk wurde danach mit 1  $\text{mL min}^{-1}$  PBS (pH 7,6) an der HPLC-Anlage gewaschen.

#### **Affinitätsexperiment**

Es wurde 1 mL Kaninchenserum (1:2 in PBS (pH 7,6)) manuell mit einer Spritze (1 mL), versehen mit einer Kanüle (1,60  $\times$  40 mm), die mittels Anschlussstück mit dem Inline-Solvent-Filter verschraubt wurde, injiziert. Die Disk wurde dann an die HPLC-Anlage Agilent Series 1200 mit Anschlussstücken angeschlossen. Davor und dahinter wurden jeweils Inline-Solvent-Filter mit einer Fritte (20  $\mu\text{m}$ ) geschaltet, um zu vermeiden, dass Partikel in die Anlage gerieten. Sie wurde mit 2,0  $\text{mL min}^{-1}$  PBS (pH 7,6) für 10 min gewaschen. Es folgte der Elutionsschritt mit 2,0  $\text{mL min}^{-1}$  Glycin-HCl-Lösung (pH 2,2, 2,0 bzw. 1,8) für 5 min. Im Anschluss wurde die Disk erneut mit 2,0  $\text{mL min}^{-1}$  PBS für 5 min gewaschen. Die Detektionswellenlänge betrug 280 nm. Nach den Experimenten wurde die Monolithdisk mit PBS (pH 7,6, 0,1 Gew.-% Natriumazid) gewaschen und bei 4 °C gelagert. Die Integration des Elutionssignals erfolgte mit der Gerätesoftware. Die Integrationsgrenzen waren der Elutionsbeginn (10 min) und das Elutionsende (15 min). Es wurden jeweils Dreifachbestimmungen durchgeführt.

### D. Kalibriergeraden

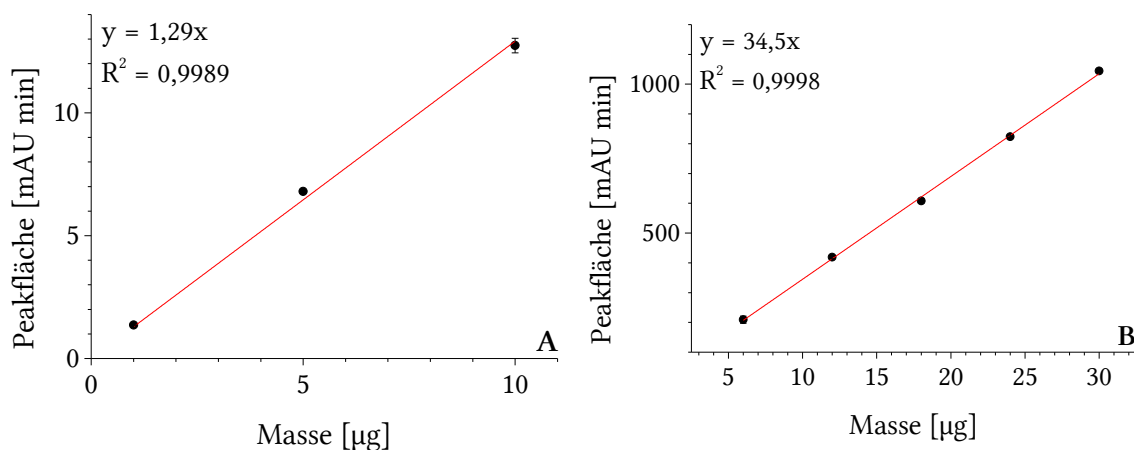
Für die Erstellung der Kalibriergeraden, die in Abbildung 3.2 dargestellt sind, zur Quantifizierung des eluierten IgGs mittels Monolithkapillarsäule (**A**) bzw. Monolithdisks (**B**) wurde aus Kaninchenserum isoliertes IgG verwendet. Ausgehend von einer Stammlösung ( $1 \text{ mg mL}^{-1}$  in Glycin-HCl-Lösung (pH 2,2)) wurden zwei Verdünnungsreihen hergestellt. Die Zusammensetzungen für Kalibriergerade **A** sind in Tabelle 3.13 und die für Kalibriergerade **B** in Tabelle 3.14 angegeben. Die Messungen wurden für **A** an der HPLC-Anlage UltiMate® 3000 mit  $0,4 \text{ mL min}^{-1}$  und für **B** an der HPLC-Anlage Agilent 1200 Series mit  $2 \text{ mL min}^{-1}$  durchgeführt. Die Detektion erfolgte bei 280 nm. Die HPLC-Anschlüsse wurden über ein Verbindungsstück verbunden, es wurde keine Kapillarsäule bzw. kein Inline-Solvent-Filter angeschlossen. Für jede Lösung wurde eine Fünffachbestimmung durchgeführt. Die Signale wurden mit der jeweiligen Gerätesoftware integriert. Die Mittelwerte wurden gegen die injizierte Masse (IgG) aufgetragen und die Punkte linear gefittet, wobei der Schnittpunkt mit dem Nullpunkt festgelegt wurde. Der angegebene Fehler entspricht der Standardabweichung.

**Tabelle 3.13.** Verdünnungen für Kalibriergerade **A** und injizierte Massen von Immunglobulin G (IgG) mit  $10 \mu\text{L}$  Injektionsvolumen.

Konzentration [ $\text{mg mL}^{-1}$ ]	V(IgG-Lösung) [ $\mu\text{L}$ ]	V(Glycin-HCl-Lösung) [ $\mu\text{L}$ ]	m(IgG) [ $\mu\text{g}$ ]
0,1	20	180	1
0,5	100	100	5
1,0	200	0	10

**Tabelle 3.14.** Verdünnungen für Kalibriergerade **B** und injizierte Massen von Immunglobulin G (IgG) mit  $30 \mu\text{L}$  Injektionsvolumen.

Konzentration [ $\text{mg mL}^{-1}$ ]	V(IgG-Lösung) [ $\mu\text{L}$ ]	V(Glycin-HCl-Lösung) [ $\mu\text{L}$ ]	m(IgG) [ $\mu\text{g}$ ]
0,2	40	160	6
0,4	80	120	12
0,6	120	80	18
0,8	160	40	24



**Abbildung 3.2.** Kalibriergeraden zur Quantifizierung des in Affinitätsexperimenten eluierten Immunglobulin G (IgG) mittels (A) Monolithkapillarsäule und (B) Monolith-disks.

### 3.8.4 Proteinbindungskapazität

#### A. Bicinchoninsäure-Test (BCA-Test)

Der BCA-Test wurde mit Fractogel® EMD Epoxy (M), pulverisiertem monolithischen Material, das mit GE 500 und BDE (60 %) hergestellt wurde, demselben monolithischen Material nach Reinigung mit DMSO, GE 500, GE 500 in 1,4-Dioxan/MTBE (2:3), 1,4-Dioxan/MTBE (2:3), 1,4-Dioxan/MTBE (2:3) mit Bortrifluoridetherat (1,25 Vol.-%, 1:10 in 1,4-Dioxan), BDG, EDG, BDE und TEPIC qualitativ unter Verwendung des BCA Protein Assay Kits und nach Vorschrift desselben durchgeführt. Feststoffe wurden mit einer Spatelspitze und Flüssigkeiten mit ca. 100  $\mu\text{L}$  eingesetzt. Die Temperierung erfolgte bei 37 °C für 30 min.

#### B. Rinderserumalbumin-Nitrothiobenzoessäure-Konjugat (BSA-TNB)

##### Synthese

Es wurden 400 mg BSA (6 mmol) in 20 mL PBS-B (pH 8) gelöst (20 mg  $\text{mL}^{-1}$ ). Daneben wurden 50 mg DTNB (0,1 mmol) in 5 mL PBS-B gelöst (10 mg  $\text{mL}^{-1}$ ) und 1:4,3 mit PBS-B verdünnt (2,32 mg  $\text{mL}^{-1}$ ). Zu 500  $\mu\text{L}$  der BSA-Lösung wurden 500  $\mu\text{L}$  der DTNB-Lösung gegeben (20 äq. DTNB/BSA). Die Reaktionsmischung wurde 15 min bei Raumtemperatur mit 800 rpm geschüttelt. Anschließend wurde das Konjugat durch Aufreinigung des Ansatzes (1 mL) mit einer PD-10-Säule isoliert. Die Elution erfolgte mit 3,5 mL Wasser. Insgesamt wurde die Synthese 20-mal wiederholt. Die vereinigten Eluate wurden unter vermindertem Druck eingeeengt und anschließend mit Wasser auf 10 mL aufgefüllt. Unter

der Annahme, einer hundertprozentigen Wiederfindung des Proteins nach der Elution, ergab sich eine Konzentration des Konjugats von  $20 \text{ mg mL}^{-1}$ .

### **Bestimmung der Kopplungsdichte**

Das Konjugat BSA-TNB ( $20 \text{ mg mL}^{-1}$ ) wurde 1:20 mit PBS-A (pH 6) verdünnt ( $1 \text{ mg mL}^{-1}$ ). Es wurde 1 mL der Lösung ( $0,02 \text{ } \mu\text{mol}$  BSA) mit 1 mL einer DTT-Lösung ( $20 \text{ mM}$  in PBS-A (pH 6),  $0,02 \text{ mmol}$ ) versetzt und 15 min bei Raumtemperatur mit 800 rpm geschüttelt. Die Lösung wurde anschließend photometrisch mit dem Gerät Evolution 220 UV-Visible Spectrophotometer bei 410 nm gemessen. Zum Vergleich wurde zu 1 mL einer Cystein-Lösung ( $1,82 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$  in PBS-A,  $0,02 \text{ } \mu\text{mol}$ ) 1 mL einer DTNB-Lösung ( $10 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$  in PBS-A,  $0,03 \text{ } \mu\text{mol}$ ) gegeben und die Lösung für 15 min bei Raumtemperatur mit 800 rpm geschüttelt. Die Lösung wurde anschließend photometrisch bei 410 nm gemessen.

### **Stabilitätsuntersuchung**

Die Stabilität von DTNB sowie des BSA-TNB-Konjugats wurde zum einen im pH-Wertbereich von 3-10 untersucht. Für den pH-Wertbereich 3-5 wurde Citratpuffer (pH 4,0), für den Bereich 6-8 PBS-B (pH 8) und für 9-10 Carbonatpuffer (pH 9,6) eingesetzt. Eine Stammlösung von DTNB ( $10 \text{ mg mL}^{-1}$  in PBS (pH 8)) wurde 1:500 mit Wasser verdünnt ( $0,02 \text{ mg mL}^{-1}$ ). Es wurden  $100 \text{ } \mu\text{L}$  der Lösung ( $5 \text{ nmol}$ ) mit  $100 \text{ } \mu\text{L}$  des entsprechenden Puffers versetzt. Ebenso wurden  $100 \text{ } \mu\text{L}$  des Konjugats ( $10 \text{ mg mL}^{-1}$  in Wasser) mit  $100 \text{ } \mu\text{L}$  des entsprechenden Puffers versetzt.

Zum anderen wurde die Stabilität von DTNB in Gegenwart von Natriumcyanoborhydrid bei unterschiedlichen pH-Werten (3-5) untersucht. Dazu wurden  $100 \text{ } \mu\text{L}$  der DTNB-Lösung ( $0,02 \text{ mg mL}^{-1}$ ) mit  $100 \text{ } \mu\text{L}$  einer Natriumcyanoborhydrid-Lösung ( $14 \text{ mg mL}^{-1}$  in entsprechendem Puffer) versetzt.

Die photometrischen Messungen erfolgten sofort, nach 1 und nach 2 h bei 410 nm.

### **Adsorption von 2-Nitro-5-thiobenzoat an Fractogel® EMD Epoxy (M)**

Es wurde 1 mL einer DTNB-Lösung ( $5 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$  in Carbonatpuffer (pH 9,6)) mit 1 mL einer DTT-Lösung ( $20 \text{ mM}$  in Carbonatpuffer (pH 9,6)) versetzt und bei Raumtemperatur mit 1200 rpm für 15 min geschüttelt. Anschließend wurde 1 mL der Lösung zu  $100 \text{ mg}$  Fractogel® EMD Epoxy (M) gegeben, das zuvor mit 1 mL PBS-A (pH 6) für 30 min bei Raumtemperatur versetzt und durch Zentrifugation abgetrennt wurde.

# Kapitel 4

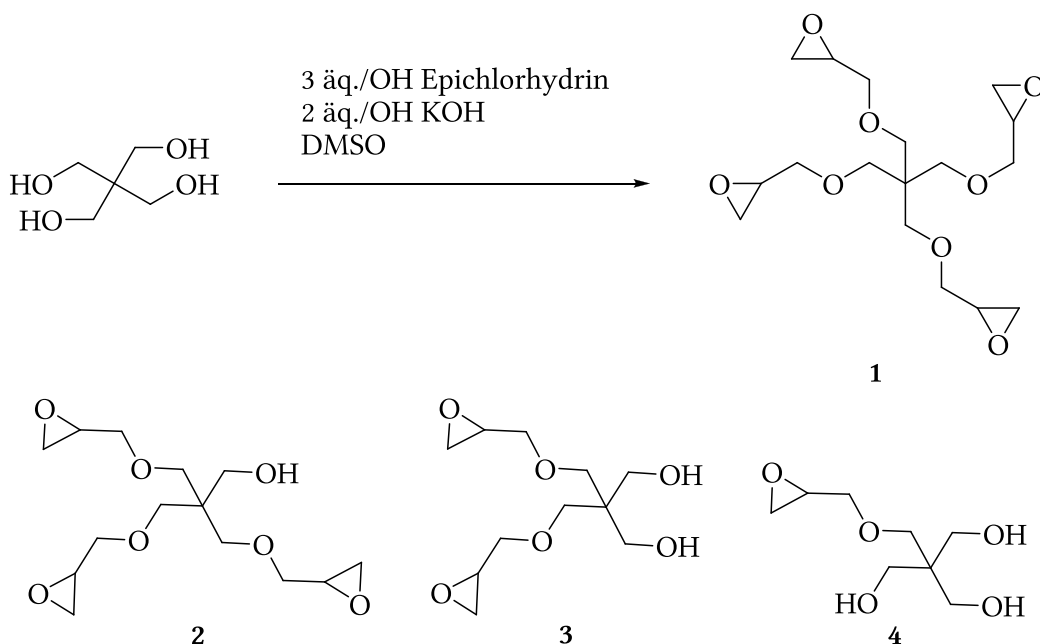
## Ergebnisse und Diskussion

### 4.1 Synthese polyfunktioneller Glycidylether

Polyfunktionelle Glycidylether finden vorwiegend als Härter in Epoxidharzen Verwendung, für die sie großtechnisch hergestellt werden. Entsprechend waren sie nur in technischer Reinheit zu erwerben, was bedeutete, dass störende Verunreinigungen vorliegen und die Epoxidgehalte chargenabhängig differieren konnten. Deshalb sollten zu Beginn der Arbeiten polyfunktionelle Glycidylether nach Literaturvorschriften synthetisiert und aufgereinigt werden. Bei den Verbindungen handelte es sich um Pentaerythritoltetraglycidylether (**1**) und Glyceroltriglycidylether (**5**).

#### 4.1.1 Pentaerythritoltetraglycidylether

In einem ersten Ansatz (Ansatz 1) wurde **1** nach einer Vorschrift von KIDA et al.<sup>[203]</sup> durch Umsetzung des Polyalkohols Pentaerythritol mit Epichlorhydrin in einer WILLIAMSONschen Ethersynthese synthetisiert. Die angegebene Literaturlausbeute betrug für die in Abbildung 4.1 angegebenen Bedingungen 79 %. Diese schien für den sonst nur in technischer Reinheit erhältlichen Ether aussichtsreich hoch zu sein. Pentaerythritol musste für die Reaktion mit Epichlorhydrin in gelöster Form vorliegen. Ersteres ist allerdings nur in wenigen organischen Lösungsmitteln gut löslich. Dazu zählen Methanol, Ethanol und Glycerol, die aber aufgrund ihrer Hydroxylfunktion ausgeschlossen waren. Die Synthese wurde deshalb in DMSO durchgeführt. Versuche, die Vorschrift abzuändern und die Synthese nur in Epichlorhydrin durchzuführen, waren nicht erfolgreich, weil sich Pentaerythritol nicht ausreichend löste. Durch eine Extraktion mit Kochsalzlösung und Diethylether sollte DMSO abgetrennt und das Produkt in die Etherphase aufgenommen werden. Nach Entfernung des Ethers blieb als Rückstand aber wider Erwarten nur ein kleines Volumen einer gelblich und hoch viskosen Flüssigkeit zurück. Möglicherweise



**Abbildung 4.1.** Synthese von Pentaerythritoltetraglycidylether (**1**) und die möglichen Nebenprodukte, trisubstituierter Glycidylether (**2**), disubstituierter Glycidylether (**3**), monosubstituierter Glycidylether (**4**).

war die Reaktion unvollständig, sodass die Produkte aufgrund nicht umgesetzter Hydroxylgruppen so polar waren, dass sie in der wässrigen Phase verblieben waren. Im Folgenden wurde aber mit der aus der Etherphase isolierten Substanz weitergearbeitet und diese analysiert. Das wahrscheinlich neben **1** aus allen, in Abbildung 4.1 gezeigten, Substitutionsstufen (**2-4**) bestehende Produktgemisch sollte mit Hilfe einer fraktionierten Destillation im Vakuum aufgetrennt werden.

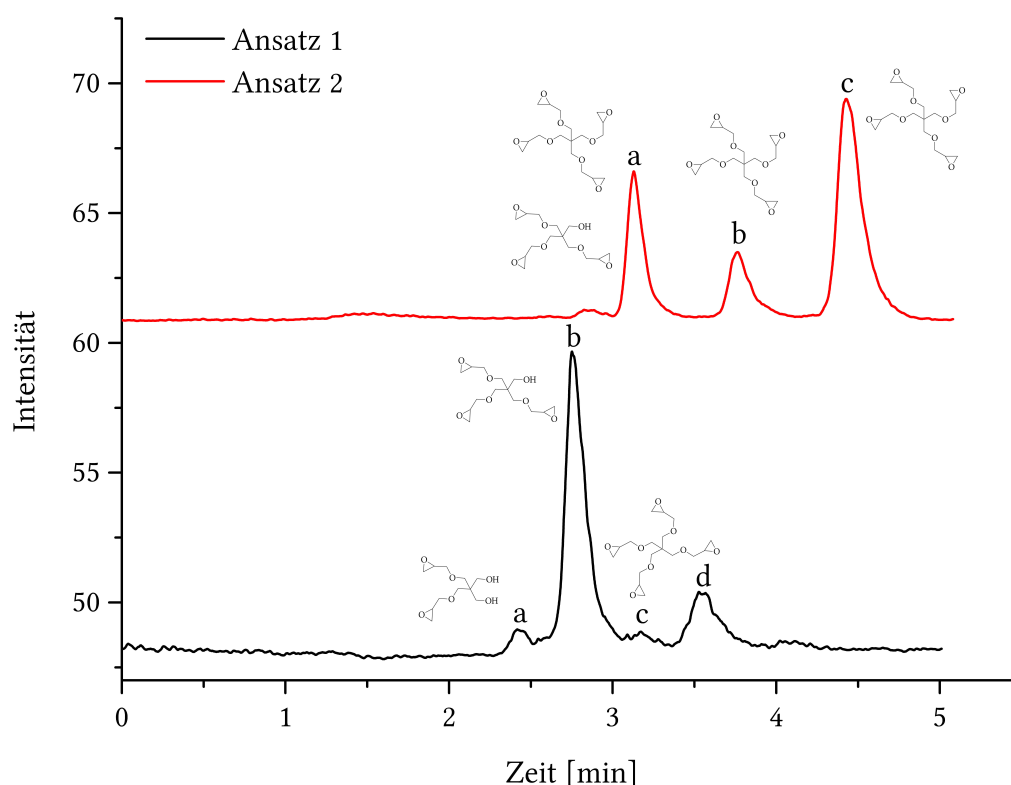
Der Vorteil gegenüber einer wie nach Vorschrift angegebenen säulenchromatographischen Aufreinigung ist der mit einer bestehenden Apparatur geringere Zeitaufwand sowie der geringere Verbrauch von Lösungsmitteln und Kieselgel. Das erzeugte Vakuum mit einer Mikrodestillationsapparatur war jedoch mit 0,1 mbar nicht ausreichend. Der Siedepunkt von **1** ist nicht dokumentiert, wurde aber auf über 400 °C geschätzt. Anhand eines Nomogramms<sup>[350]</sup> wurde für einen bei Normaldruck 500 °C hohen Siedepunkt bei einem reduzierten Druck von 0,1 mbar eine Mindesttemperatur von 220 °C bestimmt. Darüber hinaus muss bedacht werden, dass sich der Siedepunkt durch vorhandene Wasserstoffbrückenbindungen zwischen nicht reagierten Hydroxylgruppen erhöhen könnte. Diese Temperatur war nicht zu realisieren und Zersetzungsreaktionen wären wahrscheinlich.

Daraufhin wurde deshalb versucht, die Substanz auf einer Umkehrphase chromatographisch mittels einer monolithischen semi-präparativen Säule aufzureinigen, die explizit



für die Aufreinigung von viskosen Matrices geeignet war<sup>[351]</sup>. Die Detektion erfolgte mit einem ELSD, weil die Glycidylether keine Chromophoren enthalten und demnach nicht UV/Vis-aktiv sind. Die Elution erfolgte isokratisch und nach Optimierung des Mischungsverhältnisses mit Methanol/Wasser (50/50 (v/v)). Es wurden vier Signale detektiert, die, wie in Abbildung 4.2 beschriftet, fraktioniert wurden. Die eluierten Substanzen wurden massenspektrometrisch analysiert. Die Massenspektren (vgl. Abbildung A.1 auf Seite 149) ergaben, dass sich mindestens 3 ( $[M+Na]^+ = 271,1$  (271,1),  $t_R = 2,54$  min (a)) gebildet hatte. **1** ( $[M+Na]^+ = 383,5$  (383,2),  $t_R = 3,26$  min (c), 3,64 min (d)) konnte als Produkt in zwei Signalen identifiziert werden. Jedoch entstand, vermutlich aus sterischen Gründen, als Hauptprodukt **2** ( $[M+H]^+ = 305,4$  (305,2),  $[M+Na]^+ = 327,4$  (327,1), 2,85 min (b)). Die Substanzen eluierten zwar nach ihrer Polarität mit steigender Substitution in erwarteter Reihenfolge aber kaum basisliniengetreunt voneinander.

Die Synthese wurde unter gleichen Bedingungen in einem zweiten Ansatz (Ansatz 2) wiederholt. Diesmal wurde aber keine Extraktion mit Wasser und Diethylether durchgeführt, sondern DMSO unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand isokratisch mit Methanol/Wasser (45/55 (v/v)) chromatographisch aufgetrennt. In dem Chromatogramm, gezeigt in Abbildung 4.2, wurden nun nur drei Signale detektiert, die vollständig basisliniengetreunt waren. Ihre fraktionierte massenspektrometrische Analyse (vgl. Abbildung A.2 auf Seite 150) ergab, dass **1** ( $[M+H]^+ = 361,4$  (361,2),  $t_R = 3,12$  min (a),  $[M+Na]^+ = 383,4$  und 383,3 (383,2),  $t_R = 3,77$  min (b), 4,42 min (c)) als Hauptprodukt neben **2** ( $[M+Na]^+ = 327,4$  (327,1),  $t_R = 3,12$  min (a)) gebildet wurde. **1** konnte aber nicht vollständig separiert werden. Es wurde in allen drei Signalen nachgewiesen. Das dritte Signal, in dem nur **1** nachgewiesen wurde, wurde von insgesamt 18 weiteren Messungen fraktioniert. In den Massenspektren der einzelnen Fraktionen, die jeweils drei Messungen umfassten, wurde neben **1** auch das Verhältnis  $m/z = 415$  detektiert (vgl. Massenspektren in Abbildung A.3 auf Seite 152). Diese Masse wurde bereits im Eluat des ersten Syntheseansatzes gemessen (vgl. Abbildung A.1 auf Seite 149) und konnte keinem Produkt oder Edukt zugeordnet werden. Sie könnte der Summenformel ( $C_{17}H_{28}O_{10}$ ) nach einer Verbindung im Natriumaddukt entsprechen, die von **1** ausgeht und bei der zwei Epoxidgruppen hydrolysiert und zum Aldehyd oxidiert wurden. Die Verbindung wäre allerdings relativ instabil und ein NMR-Spektrum (vgl. Abbildung A.14 auf Seite 162), das von den Fraktionen aufgenommen wurde, zeigte keine chemischen Verschiebungen im Bereich von 9-11 ppm, in dem Carbonylprotonen detektiert werden. Das gemessene Spektrum entsprach ansonsten dem der Struktur von **1** und zeigte die gleichen chemischen Verschiebungen und bis auf das Signal bei 3,69 ppm auch die gleichen Multiplizitäten wie sie KIDA et al.<sup>[203]</sup> angegeben haben. Die Integration der Signale ergab jedoch mehr Protonen als in **1** gebunden sind, sodass noch Verunreinigungen vorlagen.

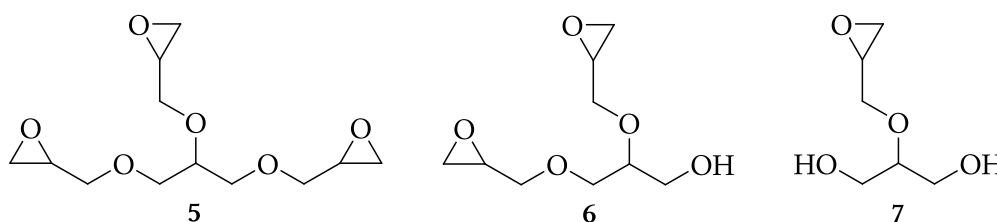


**Abbildung 4.2.** Chromatogramm von Ansatz 1 und 2 der Synthese von **1**. Chromatographische Bedingungen bei **Ansatz 1**: Säule Onyx™ Monolithic Semi-Prep (C18, 100 × 10 mm), Flussrate 3 mL min<sup>-1</sup>, Injektionsvolumen 20 µL, Detektion mit Verdampfungs-Lichtstredetektor (engl. *Evaporative Light Scattering Detector*, ELSD), Methode 1, isokratisch Methanol/Wasser (50/50 (v/v)). Die Elutionsvolumina der Signale (a) 2,54 min (2,43-2,60 min), (b) 2,85 min (2,70-3,17 min), (c) 3,26 min (3,17-3,35 min) und (d) 3,64 min (3,40 min-3,90 min) wurden in den in Klammern angegebenen Zeitbereichen fraktioniert und massenspektrometrisch analysiert (vgl. Massenspektren in Abbildung A.1 auf Seite 149). Abweichende chromatographische Bedingungen bei **Ansatz 2**: isokratisch Methanol/Wasser (45/55 (v/v)). Die Elutionsvolumina der Signale (a) 3,12 min (2,50-3,50 min), (b) 3,77 min (3,50-4,10 min) und (c) 4,42 min (4,10-5,00 min) wurden fraktioniert und massenspektrometrisch analysiert (vgl. Massenspektren in Abbildung A.2 auf Seite 150).

Obwohl **1** nachweislich synthetisiert werden konnte, wurde die Synthese nicht weiterverfolgt. Zum einen konnte es nicht reiner, als es käuflich zu erwerben ist, hergestellt werden, wie ein Vergleich mit einem NMR-Spektrum von Pentaerythritolglycidylether der Firma Frontier Scientific, Inc. (Logan, USA) zeigte. Zum anderen war aber vor allem absehbar, dass für die Versuche der Monolithherstellung nicht ausreichend Substanz mittels HPLC säulenchromatographisch isoliert werden konnte.

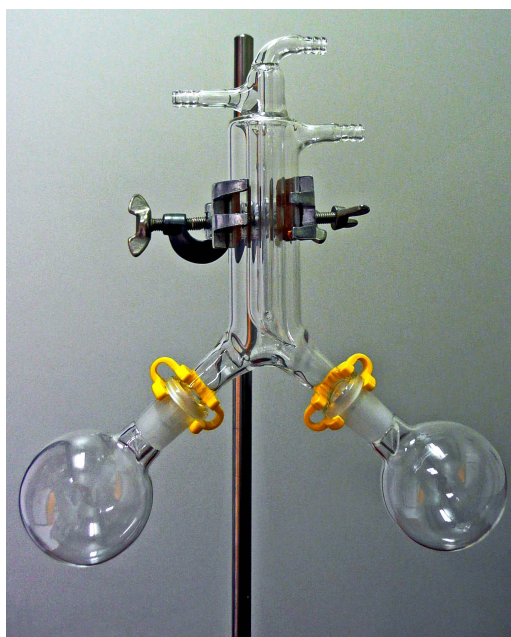
### 4.1.2 Glyceroltriglycidylether

Daraufhin wurde versucht **5** als ein Glycidylether zu synthetisieren, der im Vergleich zu **1** eine Glycidyleinheit weniger aufweist. Die Struktur ist neben denen möglicher Substitutionsprodukte in Abbildung 4.3 gezeigt. Die Annahme war, dass aufgrund dessen hierbei die vollständige Substitution durch sterische Hinderung weniger beeinträchtigt ist. Außerdem wurde vermutet, dass der Siedepunkt niedriger liegt und eine destillative Aufreinigung im Vakuum erleichtert ist.



**Abbildung 4.3.** Struktur von Glyceroltriglycidylether (**5**) sowie den Nebenprodukten disubstituierter (exemplarische Struktur) (**6**) und monosubstituierter Glycidylether (**7**).

Zunächst sollte **5** nach einer Vorschrift von HAN et al.<sup>[205]</sup> über die Bildung eines Halohydrins und anschließender Dehydrohalogenierung synthetisiert werden (Ansatz 1). Die massenspektrometrische Analyse (vgl. Massenspektrum in Abbildung A.4 auf Seite 153) des Ansatzes zeigte jedoch, dass sich nur **7** ( $[M+Na]^+ = 171,2$  (171,1)) gebildet hatte. Die Synthese wurde daraufhin analog der von **1** aber lösungsmittelfrei durchgeführt (Ansatz 2), da Glycerol als Edukt bereits als Flüssigkeit vorlag und im Gegensatz zu Pentaerythritol nicht gelöst werden musste. Für die Destillation wurde eine Kurzwegvakuumdestillationsapparatur angefertigt, von der ein Foto in Abbildung 4.4 gezeigt ist. Es wurde davon ausgegangen, dass die Ether sehr viskos sind<sup>[203]</sup>. Deshalb sollten die Wege der Apparatur so kurz wie möglich gehalten werden, sodass die Substanzen in die Vorlage überführt werden und nicht in der Apparatur, nachdem sie kondensiert sind, haften bleiben. Für einen externen Temperaturfühler wurde eine passende Einschmelzung gefertigt. Das Vakuum betrug mit der neuen Apparatur 0,06-0,008 mbar und lag somit ca. eine Zehnerpotenz niedriger als mit der ursprünglichen Apparatur. Bei einer Temperatur von 177 °C konnte eine Fraktion gewonnen werden. Der Ansatz wurde bei der Temperatur aber schnell hochviskos und konnte nicht weiter destilliert werden. Die isolierte Fraktion wurde mittels NMR und hochauflösender Massenspektrometrie (engl. *High Resolution Mass Spectrometry*, HRMS) analysiert (vgl. Abbildung A.5 auf Seite 153). Es wurden **5** ( $[M+K]^+ = 299,09$  (299,09)), **6** ( $[M+H]^+ = 205,11$  (205,11),  $[M+K]^+ = 243,06$  (243,06)) und **7** ( $[M+H]^+ = 149,08$  (149,08)) detektiert. Die unterschiedlich hoch substituierten Glycidylether konnten demnach nicht getrennt werden. Daneben lag noch eine



**Abbildung 4.4.** Angefertigte Kurzwegvakuumdestillationsapparatur mit Destillationskolben (links) und Vorlage (rechts).

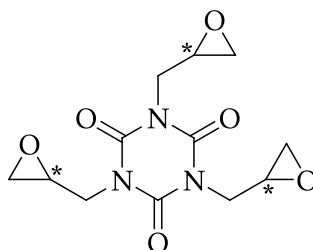
Substanz mit dem Verhältnis  $m/z = 278,16$  vor, die auch schon vor der Destillation im Ansatz vorhanden war, aber keiner Verbindung, die sich von **5** ableitete, zugeordnet werden konnte. Die NMR-Spektren bestätigten die Ergebnisse der massenspektrometrischen Analyse. Die chemischen Verschiebungen der Signale stimmten mit denen aus dem Spektrum von **1** (vgl. Abbildung A.14 auf Seite 162) überein. Ein Vergleich mit einem aufgenommenen Spektrum vor der Destillation (vgl. Abbildung A.15 auf Seite 162) zeigte jedoch keine Verbesserung der Reinheit. Im Bereich von 3,95-3,28 ppm wurde vor und nach der Destillation ein Multiplett gemessen, bei dem keine Zuordnungen getroffen werden konnten und das auf die Überlagerung der Signale aller drei Substitutionsprodukte hindeutete. Außerdem wurden bei 6,01 und 6,27 ppm zwei Signale registriert, die im Bereich von Alkenen liegen und nicht erklärt werden konnten. Diese lagen auch schon in der Probe des unaufgereinigten Produktgemisches vor, sodass sie nicht durch Zersetzung während der Destillation entstanden sein konnten. Die zur Kontrolle aufgenommenen Spektren der Edukte (vgl. Abbildung A.17 auf Seite 163), zeigten, dass sie auch nicht durch diese eingetragen wurden.

Ein weiterer Synthesansatz (Ansatz 3) wurde deshalb säulenchromatographisch mit einer Normalphase unter Verwendung von Ethylacetat/Cyclohexan (3:7) als Eluent aufgereinigt. Das NMR-Spektrum (vgl. Abbildung A.16 auf Seite 163 bzw. Abbildung A.18 auf Seite 164) zeigte nicht mehr das Multiplett im Bereich von 3,95-3,28 ppm, jedoch wieder die Signale bei 6,01 und 6,27 ppm.

Beide polyfunktionelle Glycidylether, **1** und **5**, konnten nachweislich synthetisiert werden, doch stellte sich nach Versuchen der Aufreinigung mittels Destillation im Vakuum, automatisierter säulenchromatographischer Aufreinigung mit einer semi-präparativen Umkehrphasen-Säule und manuell durchgeführter Normalphasenchromatographie heraus, dass sie dem Aufwand entsprechend weder ausreichend rein noch in ausreichender Menge isoliert werden konnten. Nach Analyse eines Glyceroltriglycidylethers der Firma Raschig GmbH (Ludwigshafen) mittels NMR (vgl. Abbildung A.19 auf Seite 164) wurde entschieden, Monolithsynthesen unter anderem mit diesem Monomer weiterzuführen und die Ether nicht selbst herzustellen.

## 4.2 Monolithsynthese mit Tris(2,3-epoxypropyl)isocyanurat (TEPIC)

Im Folgenden wurde vorerst an Monolithsynthesen, die während der vorangegangenen Diplomarbeit<sup>[352]</sup> mit Tris(2,3-epoxypropyl)isocyanurat (TEPIC) als Monomer durchgeführt wurden, angeknüpft. TEPIC, dessen Struktur in Abbildung 4.5 gezeigt ist, liegt bei Raumtemperatur (RT) als farbloses und geruchloses Pulver oder Granulat vor und ist eine trifunktionelle Epoxidverbindung mit drei Chiralitätszentren.



**Abbildung 4.5.** Struktur von Tris(2,3-epoxypropyl)isocyanurat (TEPIC), die Chiralitätszentren sind mit einem (\*) gekennzeichnet.

Aufgrund seiner Symmetrie reduziert sich die Anzahl der acht theoretisch möglichen Diastereomere auf vier, die in die beiden Isomere  $\alpha$ -TEPIC (*SSR*, *RRS*) und  $\beta$ -TEPIC (*SSS*, *RRR*) eingeteilt werden. TEPIC wird von Nissan Chemical Industries, Ltd. (Tokio, Japan) bzw. wurde von Ciba Geigy (Novartis Deutschland GmbH, Nürnberg) mit Reinheiten von ca. 90 % bzw. > 97 % hergestellt<sup>[353]</sup>. Das in der vorliegenden Arbeit verwendete Pulver wurde von Aldrich (Steinheim) kommerziell erworben, von dem die genaue Herkunft aber nicht ermittelt werden konnte. Die Reinheit wurde nach dem Analysenzertifikat mittels Elementaranalyse von Stickstoff (48,22 %) und Kohlenstoff (13,99 %) bestimmt, die mit den mit ChemDraw Standard 12.0.2.1076 von Cambridge Soft (Waltham, USA)

**Tabelle 4.1.** Löslichkeiten der beiden Isomere  $\alpha$ -TEPIC und  $\beta$ -TEPIC von Tris(2,3-epoxypropyl)isocyanurat (TEPIC), dabei bedeuten ++ > 1,00 g mL<sup>-1</sup>, + > 0,10 g mL<sup>-1</sup>, - > 0,01 g mL<sup>-1</sup>, -- < 0,01 g mL<sup>-1</sup>, unl = unlöslich und RT = Raumtemperatur, Sdp. = Siedepunkt<sup>[347]</sup>.

Lösungsmittel	$\alpha$ -TEPIC			$\beta$ -TEPIC		
	RT	Sdp.	80 °C	RT	Sdp.	80 °C
Methanol	--	+		unl	--	
Ethanol	--	+		unl	-	
<i>n</i> -Butanol	--		++	--		+
Ether	unl	unl		unl	unl	
Tetrahydrofuran	-	++		unl	-	
Epichlorhydrin	+			-		
1,4-Dioxan	+		++	-		+
Chloroform	++	++		-	+	
Tetrachlormethan	--	-		unl	--	
Aceton	+	++		--	-	
Butanon	-	++	++	-	+	+
Benzol	--	+	+	unl	-	-

berechneten Werten für Stickstoff (48,4 %) und Kohlenstoff (14,14 %) nahezu übereinstimmten. Der Epoxidgehalt sollte demnach nahezu 100 % betragen.

HOSOYA et al.<sup>[192]</sup> stellten bereits Monolithe für die Separation kleiner Moleküle mit TEPIC her, indem sie es mit 4-[(4-Aminocyclohexyl)methyl]cyclohexan (BACM) als Amin in PEG 200 bei 80 °C 12 h polymerisierten. TEPIC setzten sie dabei als racemisches Gemisch, erworben von Nissan Chemical Industries, ohne weitere Aufreinigung ein.

Im Unterschied zu den Arbeiten von HOSOYA et al. wurde für die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Monolithsynthesen im ersten Schritt  $\alpha$ -TEPIC aufgrund seiner besseren Löslichkeit aus kommerziell erworbenem Pulver, in dem beide Isomere vorlagen (vgl. Diffraktogramm in Abbildung A.7 (A) auf S. 156), isoliert und dieses anschließend in einer Autopolymerisation ohne ein weiteres Monomer zur Reaktion gebracht.

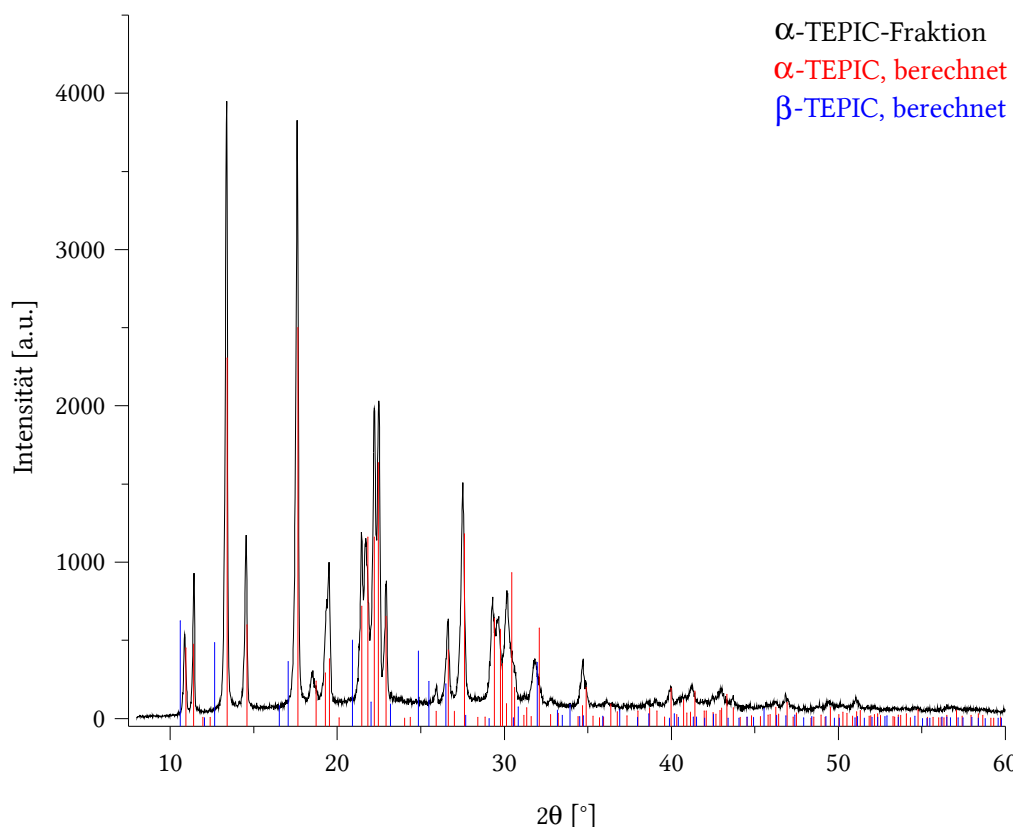
#### 4.2.1 Isomerenreine Aufreinigung von TEPIC

Die Isomere  $\alpha$ - und  $\beta$ -TEPIC unterscheiden sich in ihren physikalischen Eigenschaften, sowie der Löslichkeit. Sie sind prinzipiell, wie Tabelle 4.1 entnommen werden kann, sowohl in polaren als auch in unpolaren Lösungsmitteln bei Raumtemperatur nur gering löslich. Im Vergleich ist  $\alpha$ -TEPIC das löslichere Isomer von beiden.

Für die Monolithherstellung musste TEPIC im Porogen gelöst vorliegen und  $\beta$ -TEPIC in-

sofern aufgrund seiner auch bei erhöhter Temperatur schlechten Löslichkeit abgetrennt werden. Anfänglich wurde nach JOEL und BECKER<sup>[347]</sup> die Aufreinigung von  $\alpha$ -TEPIC aus kommerziell erworbenem Pulver durch mehrfaches Umkristallisieren aus Methanol versucht, dessen Reinheit anschließend aber nicht vereinfacht über den Schmelzpunkt kontrolliert werden konnte, weil der Schmelzbereich von  $\alpha$ -TEPIC (95-103 °C)<sup>[354]</sup> in dem von der Isomerenmischung (82-152 °C)<sup>[354]</sup> liegt. Die Reinheit wurde deshalb durch Aufnahme von Pulverdiffraktogrammen bestimmt, deren Empfindlichkeit im Allgemeinen mit 2-5 % angegeben wird. Die Reflexe der Isomere wurden auf Basis ihrer in der ICDD-Datenbank (The International Centre for Diffraction Data) erfassten Kristallstrukturen berechnet. Diese überlagerten sich nicht, sodass eine eindeutige Zuordnung möglich war. Nach der ersten Umkristallisation waren in der Probe, wie das Diffraktogramm (vgl. Abbildung A.7 (B) auf S. 156) zeigt, noch beide Isomere enthalten, was auch zu erwarten war, da sich trotz schlechter Löslichkeit noch  $< 0,01 \text{ g mL}^{-1}$   $\beta$ -TEPIC in Methanol lösen. Erst nach der vierten Umkristallisation lag  $\alpha$ -TEPIC isomerenrein vor, wie das Diffraktogramm (vgl. Abbildung A.7 (C) auf S. 156) bestätigte. Durch Umkristallisation war somit die isomerenreine Aufreinigung zwar möglich, aber zugleich auch zeitaufwendig.

Um die Aufreinigung zu automatisieren und gleichzeitig die Reinheit des Pulvers bei Verwendung ggf. unterschiedlicher Chargen in der späteren Monolithherstellung kontrollieren zu können, wurde die chromatographische Aufreinigung nach einem Protokoll des Hauptverbands der gewerblichen Berufsgenossenschaften Fachausschuss „Chemie“<sup>[348]</sup> getestet. Dazu wurde eine Phosphorsäurelösung (pH 6) mit Acetonitril (90/10 (v/v)) als Eluent B und eine Lösung bestehend aus Phosphorsäurelösung (pH 6) und Wasser (50/50 (v/v)) als Eluent A eingesetzt. Das Chromatogramm von  $\alpha$ -TEPIC (vgl. Abbildung A.6 auf Seite 154) zeigt ein Signal bei einer Retentionszeit von 15,6 min und zwei weitere Signale in einem hohen Untergrund. Für die chromatographische Aufreinigung des Pulvers, bei dem für  $\beta$ -TEPIC ein zusätzliches Signal erwartet wurde, ergab sich ein weitgehend identisches Chromatogramm, wie die Überlagerung mit dem Chromatogramm von  $\alpha$ -TEPIC (vgl. Abbildung A.6 auf Seite 154) zeigt. Die Elutionsbedingungen schienen ohnehin für die verwendete Säule ungeeignet zu sein. Denn die Substanzen eluierten erst nach dem Wechsel von Eluent A auf Eluent B nach 15,5 min. Die Methode wurde daraufhin auf einen Methanol/Wasser-Gradienten umgestellt. Doch auch hier waren die Chromatogramme (vgl. Abbildung A.6 auf Seite 154) nahezu identisch, mit dem Unterschied, dass bei der Trennung von  $\alpha$ -TEPIC zwei zusätzliche Signale detektiert wurden. Die massenspektrometrische Analyse mittels HPLC-MS ergab, dass allen Signalen TEPIC zugeordnet werden konnte. Ob es sich aber tatsächlich um die aufgetrennten Isomere handelte, wurde nicht geklärt. Die Zuordnung der Signale zu den entsprechenden Isomeren und eine Methodenoptimierung hätte zu viel Zeit in Anspruch genommen.



**Abbildung 4.6.** Pulverdiffraktogramm von kommerziell erworbenem Tris(2,3-epoxypropyl)isocyanurat (TEPIC) nach einmaliger Aufreinigung durch selektives Lösen von  $\alpha$ -TEPIC in Chloroform bei Raumtemperatur.

Daraufhin wurde deshalb alternativ die sehr gute Löslichkeit von  $\alpha$ -TEPIC ( $> 1,00 \text{ g mL}^{-1}$ ) bzw. die schlechtere von  $\beta$ -TEPIC ( $> 0,01 \text{ g mL}^{-1}$ ) in Chloroform bei Raumtemperatur genutzt.

Durch Lösen des Pulvers und Abfiltrieren des ungelösten Feststoffs ( $\alpha$ -TEPIC-Fraktion) konnte nach nur einmaliger Durchführung  $\alpha$ -TEPIC isomerenrein gewonnen werden. Die Reinheit wurde, wie bereits beschrieben, durch Aufnahme eines Pulverdiffraktogramms festgestellt. Es ist in Abbildung 4.6 dargestellt und zeigt keine mit  $\beta$ -TEPIC übereinstimmenden Reflexe. Die Isomerentrennung bei Raumtemperatur durch selektives Lösen von  $\alpha$ -TEPIC in Chloroform ist bislang noch nicht beschrieben und ist im Vergleich zur Umkristallisation und chromatographischen Aufreinigung deutlich Zeit, Geräte und Lösungsmittel sparer.



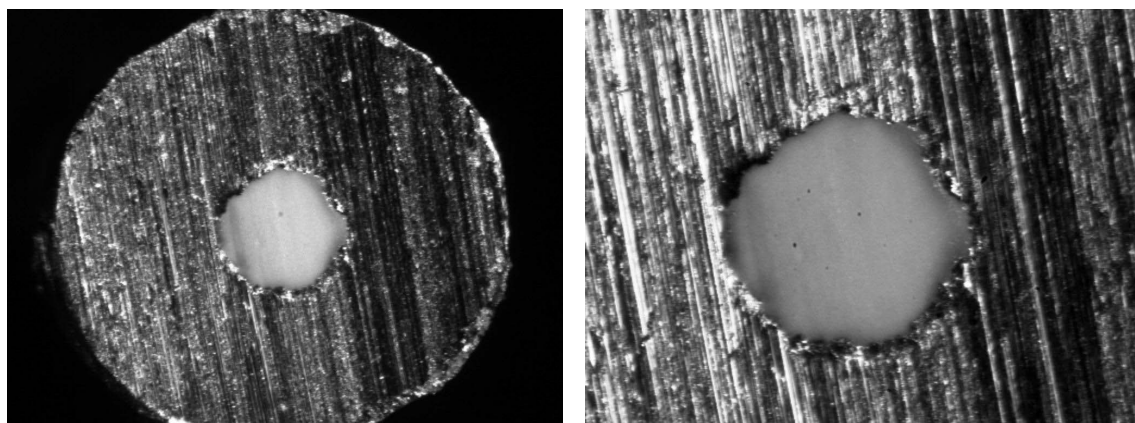
### 4.2.2 Herstellung von Kapillarsäulen

Die Optimierung der Reaktionsbedingungen, hinsichtlich der Porogenzusammensetzung und des Porogenanteils sowie der Katalysatormenge und der Reaktionstemperatur, wurden bereits im Rahmen der vorangegangenen Diplomarbeit<sup>[352]</sup> mit TEPIC, noch als Isomengemisch, durch Synthesen in Gewindegläschen ( $V = 2 \text{ mL}$ ) durchgeführt. Die geeignetste Porogenmischung bestand aus 1,4-Dioxan und dem für das Polymer unlöslichen Coporogen Isooctan im Verhältnis 4:1. Obwohl beide Isomere in 1,4-Dioxan ab  $80^\circ\text{C}$  gut löslich sind (vgl. Tabelle 4.1 auf Seite 88), musste die Reaktionstemperatur mindestens  $90^\circ\text{C}$  betragen, damit sich TEPIC in der Mischung mit Isooctan löste. Eine höhere Temperatur, um etwa den Isooctananteil erhöhen zu können, war aufgrund des Siedepunkts von 1,4-Dioxan bei  $101^\circ\text{C}$  nicht möglich. Eine makroporöse globuläre Struktur bildete sich erst ab einem Porogenanteil von 62 Vol.-% aus, bei höheren Anteilen als 68 Vol.-% blieben Überstände zurück. Quecksilber-Intrusionsporosimetriemessungen ergaben für den Monolith, der mit 62 Vol.-% Porogen hergestellt wurde, eine Porosität von 58 % und eine monomodale Porengrößenverteilung mit  $12 \mu\text{m}$  großen Poren.

Unter diesen Bedingungen wurde begonnen, mit dem aufgereinigten  $\alpha$ -TEPIC monolithische Kapillarsäulen herzustellen. Dabei mussten folgende Fragen erarbeitet werden:

- Ist eine waagerechte oder senkrechte Position der Säule während der Polymerisation, hinsichtlich der Vermeidung einer Spaltenbildung zwischen Monolith und Säulenwand, vorteilhafter?
- Wie bzw. in welcher Vorrichtung ist eine gleichmäßige Temperierung der Säule während der Präparation gewährleistet?
- In welchem Säulenmantel wird die Säule hergestellt?
- Wie wird die Polymerisationslösung in die Säule überführt?
- Wie wird die Säule während der Präparation abgedichtet?
- Kommt es in der Säule während der Polymerisation zur Bildung von Blasen bzw. wie kann dies vermieden werden?

Die Kapillarsäulen wurden anfänglich in Edelstahlkapillaren mit den Innendurchmessern (engl. *Inner Diameter*, ID)  $125 \mu\text{m}$  und  $250 \mu\text{m}$  und mit dem für HPLC-Anschlüsse standardisierten Außendurchmesser (engl. *Outer Diameter*, OD)  $1/16''$  präpariert. Die Herstellung wurde in der letzten Phase der Diplomarbeit bereits begonnen und im Wasserbad bei  $90^\circ\text{C}$  durchgeführt. Dafür mussten zum einen die Säulen sehr dicht verschlos-

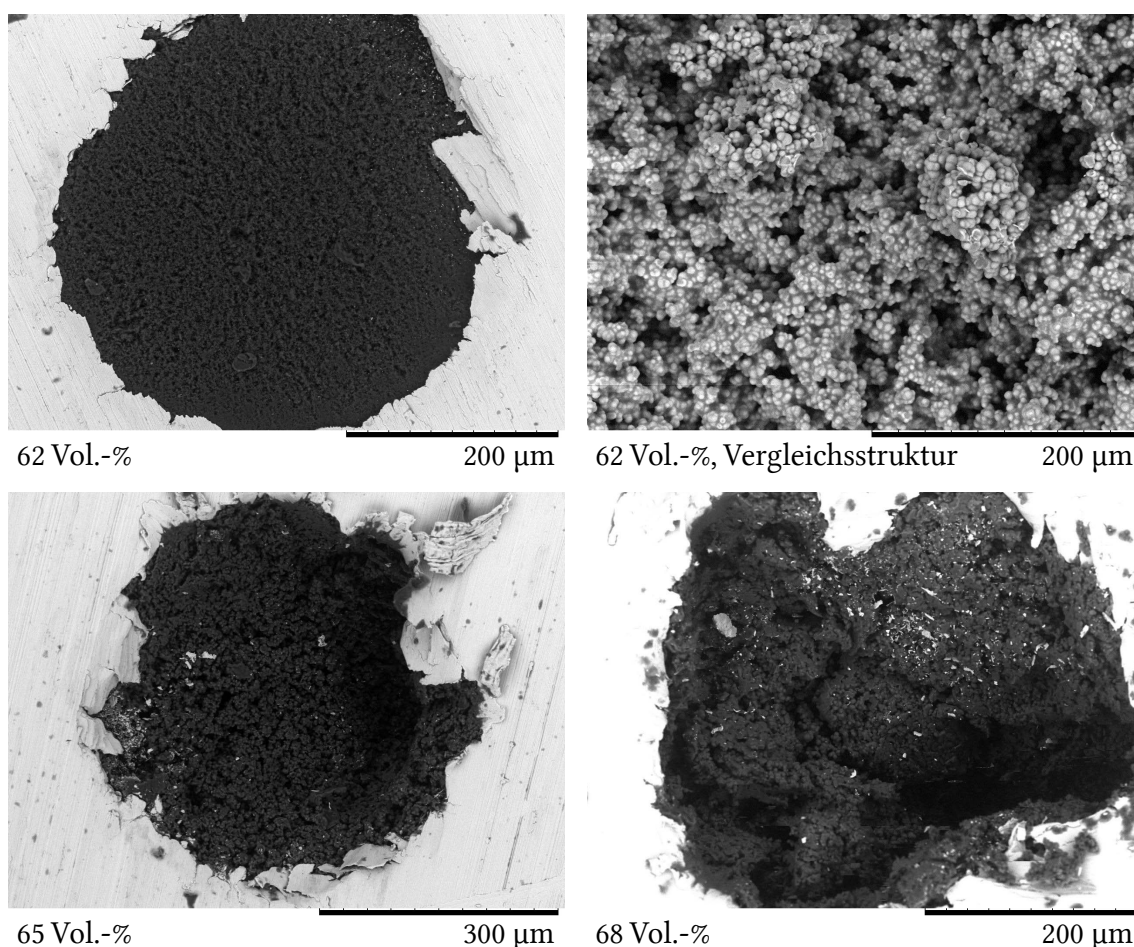


**Abbildung 4.7.** Auflichtmikroskop-Aufnahme eines Monoliths, der mit  $\alpha$ -Tris(2,3-epoxypropyl)isocyanurat ( $\alpha$ -TEPIC) in einer Edelstahlkapillare (ID 500  $\mu\text{m}$ , OD  $1/16''$ ) *in situ* hergestellt wurde.

sen werden, damit kein Wasser eindrang und zum anderen musste aufgrund der hohen Temperatur stets Wasser nachgefüllt werden. Der Aufbau sollte deshalb vereinfacht werden und die parallele Herstellung mehrerer Säulen ermöglichen. Im Folgenden wurden die Säulen in eigens angefertigten Aluminiumheizblöcken mit senkrechten Bohrungen ( $1/16''$ ) bzw. waagerechten Nuten ( $1/16''$ ) temperiert. Die Synthese in einem Ofen wie Hosoya et al.<sup>[192]</sup> durchzuführen, wurde wegen der um Größenordnungen schlechteren Wärmeleitfähigkeit von Luft im Vergleich zu der von Aluminium nicht in Betracht gezogen.

Aufgrund der kleinen Innendurchmesser wurde zunächst getestet, ob sich die Kapillaren beim Eintauchen in die Reaktionslösung durch den Kapillareffekt füllten. Dies war nicht der Fall, weshalb die Lösung eingespritzt wurde. Beim senkrechten Einsetzen der befüllten Kapillaren in den Aluminiumheizblock, ohne sie zu verschließen, trat die Lösung aus. Sie wurden drauffhin am oberen Ende mit handelsüblichen UHU patafix Klebepads verschlossen.

Um zu untersuchen, ob sich die Porenstruktur eines Monoliths, der in der Kapillarsäule hergestellt wurde, von der eines Monoliths, der, wie während der Diplomarbeit, in einem Gewindegläschen hergestellt wurde, unterscheidet, wurden monolithische Kapillarsäulen derart mit den drei Porogenanteilen 62, 65 und 68 Vol.-% hergestellt. Sowohl die Kapillarsäule als auch das Gewindegläschen wurden in einem Aluminiumheizblock temperiert. Für eine leichtere Untersuchung des Kapillarsäulenquerschnitts wurde als Innendurchmesser der Kapillaren 500  $\mu\text{m}$  gewählt. Im Anschluss an die Präparation wurden die Enden mit einem Kappgerät gekürzt, wobei darauf zu achten war, dass der Schnitt langsam durchgeführt wurde, damit der Monolith bei Hitzeentwicklung nicht beschädigt wurde. Exemplarisch wurde eine Säule zunächst unter dem Auflichtmikroskop betrach-



**Abbildung 4.8.** ESEM-Aufnahmen von Monolithen, die mit  $\alpha$ -Tris(2,3-epoxypropyl)isocyanurat ( $\alpha$ -TEPIC) als Monomer und Bortrifluorid-Tetrahydrofuran-Komplex als Katalysator mit variierendem Porogenanteil (1,4-Dioxan/Isooctan (4:1)) in Edelstahlkapillaren (ID 500  $\mu\text{m}$ , OD  $\frac{1}{16}''$ ) *in situ* hergestellt wurden sowie die Vergleichsstruktur<sup>[352]</sup> eines Monoliths, der in einem Gewindegläschen hergestellt wurde.

tet. In Abbildung 4.7 ist ein beim Sägen entstandener Grat zu sehen. Doch trotzdem ist ein vollständig phasenseparierter Monolith in der Kapillare gut zu erkennen. Einen detaillierten Blick der Struktur konnte durch die ESEM-Aufnahmen aller drei Säulen, die in Abbildung 4.8 dargestellt sind, gewonnen werden.

Die Säule, die mit 62 Vol.-% Porogen hergestellt wurde, ist durch das Sägen nicht beschädigt worden. Ihre Monolithstruktur ist allerdings von der Säulenmitte hin zum Rand inhomogen und zeigt kaum eine makroporöse Struktur, das auch in anfänglichen Versuchen während der Diplomarbeit bereits festgestellt wurde. Zum Vergleich ist eine Aufnahme eines Monoliths aus der Diplomarbeit gezeigt, der in einem Gewindegläschen ( $\varnothing$  ca. 1 cm) hergestellt wurde und bei gleicher Vergrößerung eine makroporösere Struktur aufwies. Dies bedeutete, dass sich durch Polymerisation der gleichen Monomer/Poro-



**Abbildung 4.9.** Aluminiumheizblock mit verschlossenen Kapillarsäulen in passenden Nuten ( $1/16''$ ) während der Präparation (links) und Monolithkapillarsäulen, die mit  $\alpha$ -Tris(2,3-epoxypropyl)isocyanurat ( $\alpha$ -TEPIC) als Monomer und Bortrifluorid-Tetrahydrofuran-Komplex als Katalysator mit 65 Vol.-% Porogen (1,4-Dioxan/Isooctan (4:1)) in FEP-Schläuchen (ID 0,8 mm, OD  $1/16''$ ) *in situ* hergestellt wurden (rechts).

gen-Mischung in unterschiedlichen Gefäßmaterialien und/oder mit unterschiedlichen Gefäßdurchmessern die monolithische Porenstruktur erheblich unterschied. Der Grund ist höchstwahrscheinlich die um ein Vielfaches höhere Wärmeleitfähigkeit von Edelstahl im Vergleich zu der von Glas, durch die die Phasenseparation in der Edelstahlkapillare früher eintritt, was zur Ausbildung kleinerer Poren führt (vgl. Abschnitt 2.1.3 auf Seite 9). Die anderen beiden Säulen wurden durch das Sägen stark beschädigt, aber ihre Struktur ist noch als makroporös und globulär zu erkennen. Weitere Säulenpräparationen wurden nach diesem Ergebnis mit einem Porogenanteil von 65 Vol.-% durchgeführt.

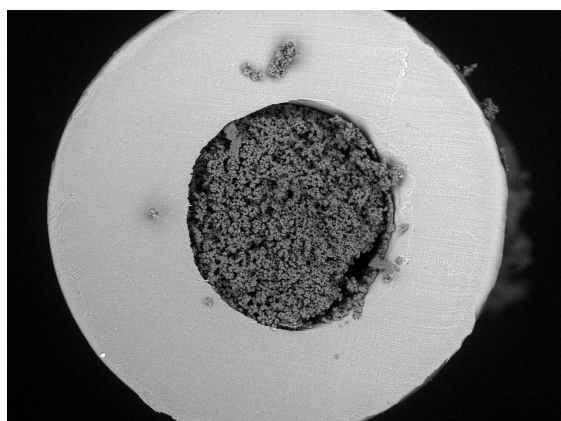
Obwohl in weiteren Versuchen nach Kürzen der Kapillare stets ein Monolith enthalten war, schien die Säule mit den UHU patafix Klebepads nicht ausreichend dicht verschlossen zu sein, um ein Auslaufen der Reaktionslösung zu vermeiden. Daraufhin wurden die Säulen im Aluminiumheizblock waagrecht in passende Nuten gelegt und in transparenten Perfluorethylenpropylen-Schläuchen (ID 0,8 mm, OD  $1/16''$ ) (engl. *Fluorinated*

*Ethylene Propylene*, FEP) hergestellt, in denen die Phasenseparation und eine eventuelle Blasenbildung beobachtet werden konnten. Die Lösung wurde sowohl eingespritzt als auch mit einer Spritze angesogen, indem der Schlauch und eine Kanüle für den Druckausgleich während des Lösens von  $\alpha$ -TEPIC bereits durch das Kappenseptum gestochen waren, aber nicht in die Lösung eintauchten. Im Anschluss wurde die Säule eingetaucht und die Lösung mit einer Spritze angesogen. Die Säulen wurden in beiden Fällen unverschlossen in den Heizblock gelegt. Wurde die Lösung eingespritzt bildeten sich kurz darauf Blasen, im Gegensatz zu den Säulen, in die die Lösung angesogen wurde. Die Bildung von Blasen konnte auch durch eine vorhergehende Entgasung der Reaktionslösung mit Helium nicht verhindert werden. In beiden Fällen aber blieb eine vollständige Phasenseparation aus. Während der Präparation musste sich demnach ein Porogenanteil verflüchtigt haben. Als funktionierender Verschluss zur Abdichtung der Schläuche erwiesen sich Eisennägel ( $\varnothing$  0,8 mm). Ein Foto der verschlossenen Säulen in den Nuten des Aluminiumheizblocks während der Präparation und der auf diese Weise hergestellten Monolithkapillarsäulen ist in Abbildung 4.9 gezeigt.

Die Vermutung, dass die Phasenseparation stark von der Wärmeleitfähigkeit des Gefäßmaterials abhängt, bestätigte sich durch die Beobachtung, dass in den Gewindegläschen die Phasenseparation bereits nach 30-60 min eintrat, während sie in den FEP-Schläuchen in Anbetracht einer um den Faktor vier schlechteren Wärmeleitfähigkeit von Perfluorethylenpropylen ( $0,26 \text{ W K}^{-1} \text{ m}^{-1}$ )<sup>[355]</sup> im Vergleich zu der von Glas ( $1,0 \text{ W K}^{-1} \text{ m}^{-1}$ )<sup>[356]</sup> erst nach 90-120 min erfolgte. Eine hergestellte Säule wurde exemplarisch zerschnitten und die Enden mittels ESEM auf strukturelle Veränderungen über die Säulenlänge und auf Fehlstellen untersucht. In den Aufnahmen in Abbildung 4.10 ist eine makroporöse und globuläre Struktur über die gesamte Länge der Säule zu erkennen. Allerdings ist auch ein Hohlraum in allen Querschnitten vorhanden, bei dem es sich der Form nach um Blasen handelte, die doch bei der Befüllung der Säule durch Ansaugen der Lösung entstanden sein konnten.

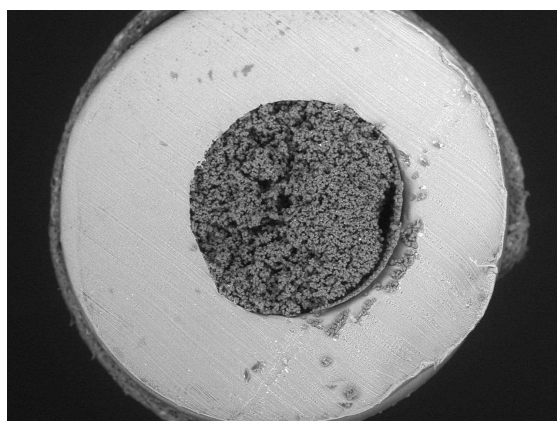
Mit einer veränderten Technik, die Lösung in die Säule zu überführen, die in Abbildung 4.11 veranschaulicht ist, konnte dies vermieden werden. Dafür wurde wie bisher die Reaktionslösung angesetzt (a) und das Gewindegläschen mit einer Schraubkappe verschlossen, durch deren Septum die Kapillare bereits durchgestochen war, aber nicht in die Lösung eintauchte (b). Nachdem  $\alpha$ -TEPIC vollständig gelöst war, wurde sie eingetaucht und eine mit Luft aufgezugene Spritze durch das Septum gestochen. Die Luft wurde langsam eingespritzt und somit ein Überdruck erzeugt (c) durch den die Lösung in die Säule aufstieg. Als sie am oberen Ende austrat (d), wurde die Säule mit einem Nagel verschlossen (e), aus der Lösung gezogen und auch am anderen Ende mit einem Nagel abgedichtet (f). Die mit dem ESEM untersuchten Querschnitte einer zerteilten Säule





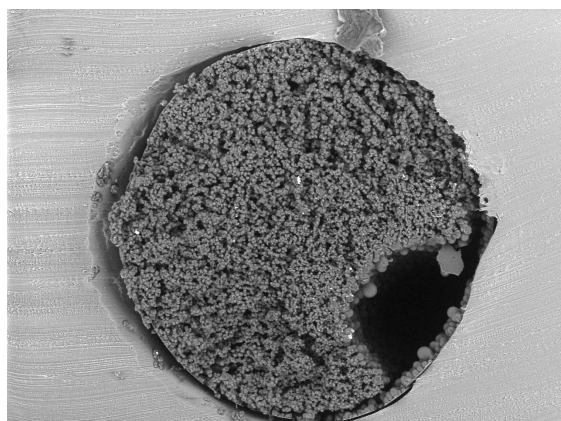
Querschnitt 1

500 µm



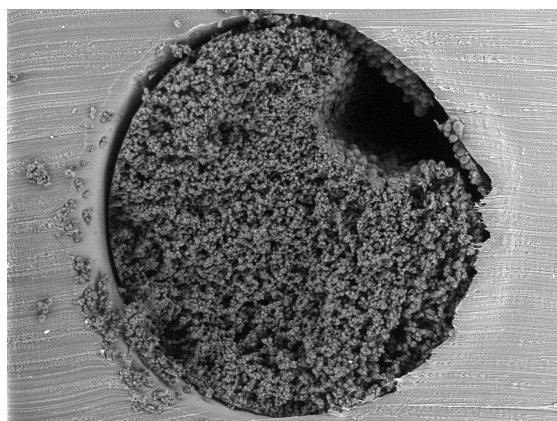
Querschnitt 2

500 µm



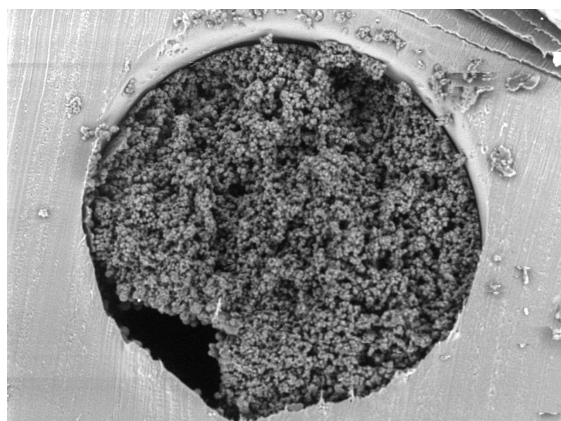
Querschnitt 3

500 µm



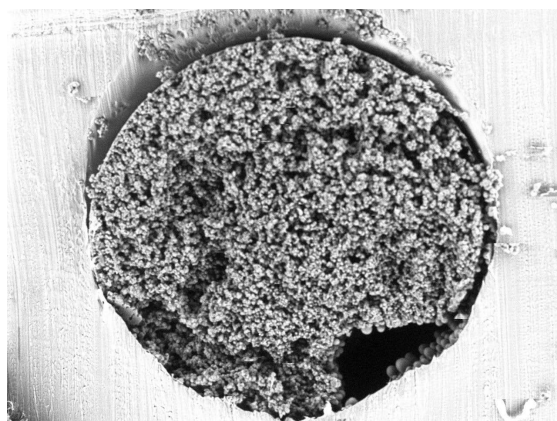
Querschnitt 4

500 µm



Querschnitt 5

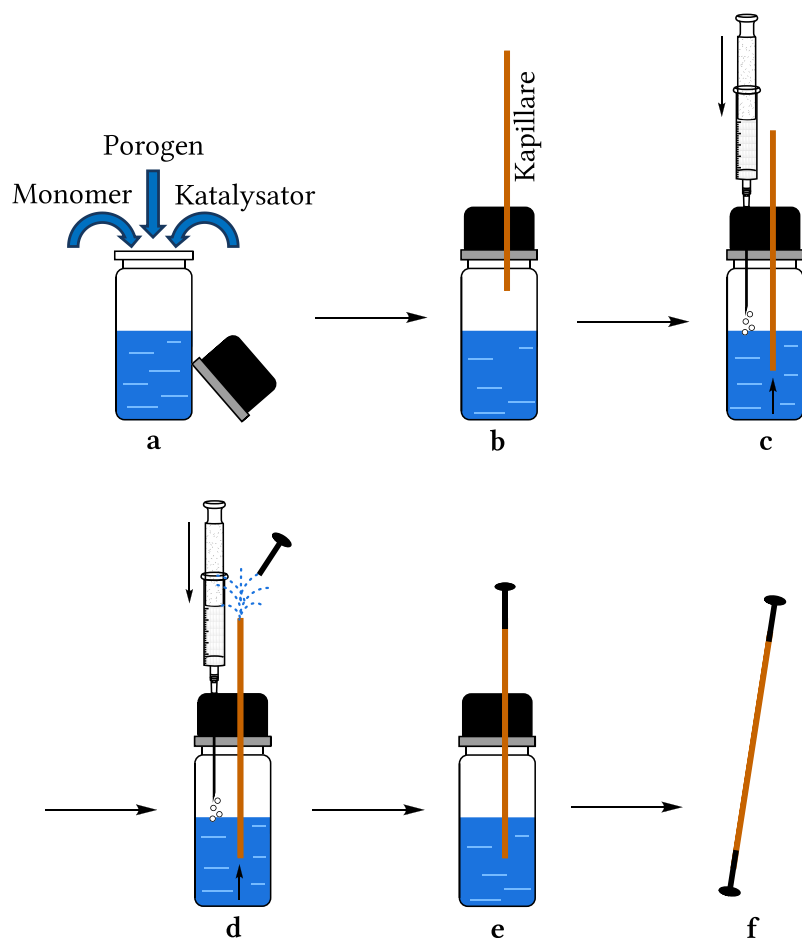
500 µm



Querschnitt 6

500 µm

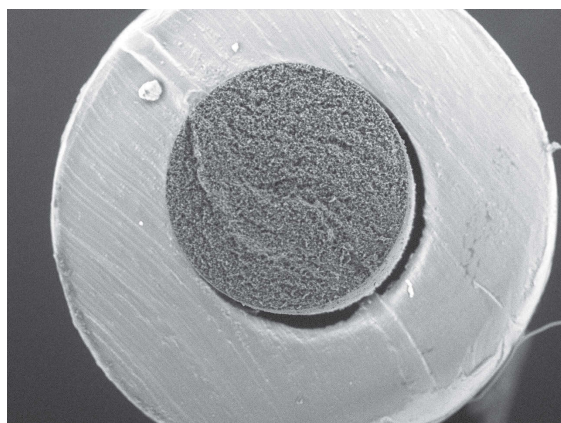
**Abbildung 4.10.** ESEM-Aufnahmen von Säulenquerschnitten einer längs zerteilten Monolithkapillarsäule, die mit  $\alpha$ -Tris(2,3-epoxypropyl)isocyanurat ( $\alpha$ -TEPIC) als Monomer und Bortrifluorid-Tetrahydrofuran-Komplex als Katalysator mit 65 Vol.-% Porogen (1,4-Dioxan/Isooctan (4:1)) in einem FEP-Schlauch (ID 0,8 mm, OD  $\frac{1}{16}$ "") in waagerechter Position *in situ* hergestellt wurde. Die Nummerierung erfolgte nach dem in Abbildung 3.1 auf Seite 64 illustrierten Schema.



**Abbildung 4.11.** Technik zur blasenfreien Befüllung von Kapillarsäulen, (a) Ansetzen der Reaktionslösung, (b) durch Septum gestochene Kapillare, (c) Einspritzen von Luft, (d + e) Verschluss der Kapillare nach Austreten der Lösung, (f) Verschluss des zweiten Kapillarendes.

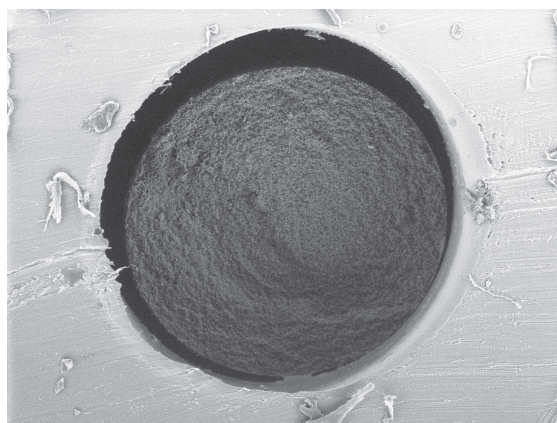
zeigten auf den Aufnahmen in Abbildung 4.12 über die Länge hinweg keine Lochfellestelle mehr. Der Monolith schien aber geschrumpft zu sein, was für organischbasierte Monolithe nicht ungewöhnlich ist. Auch Hosoya et al.<sup>[193]</sup> haben eine Schrumpfung des TEPIC/BACM-Monoliths beobachtet, woraufhin sie TEPIC durch TETRAD-C als tetrafunktionelles Monomer ersetzten. Bei besserer Haftung des Monoliths an der Säulenwand, die bei FEP als schlechtem Haftvermittler nicht gegeben ist, kann das Ablösen trotz Schrumpfung vermieden werden. Ob der Monolith sich aber auch von der Säulenwand in den Edelstahlkapillaren gelöst hatte, konnte aufgrund des Grats, der beim Sägen entstanden war, nicht überprüft werden.

Nachdem Monolithkapillaren hergestellt werden konnten, wurden sie im Folgenden hinsichtlich ihrer porösen Eigenschaften untersucht. Dafür wurden ca. 100 mg Material als Mindestmenge für eine Quecksilber-Intrusionsporosimetriemessung hergestellt. Die



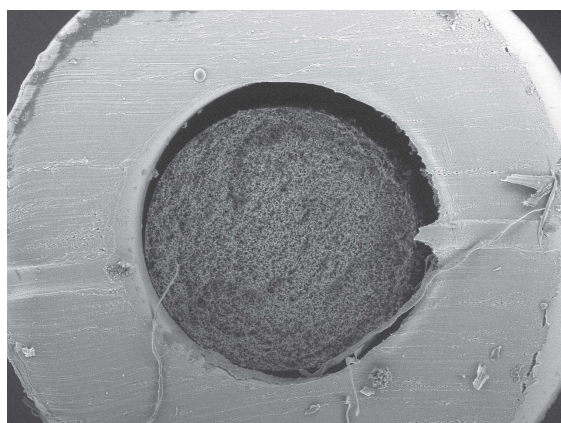
Querschnitt 2

500 µm



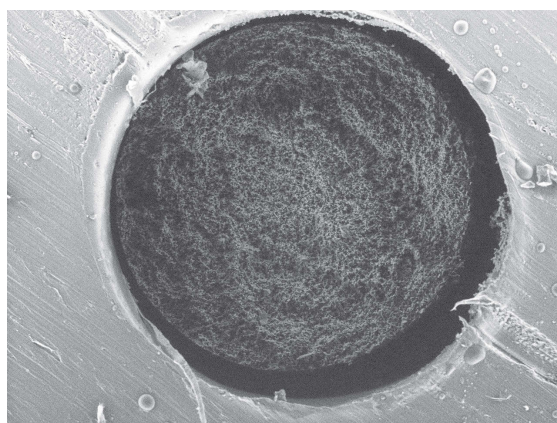
Querschnitt 3

500 µm



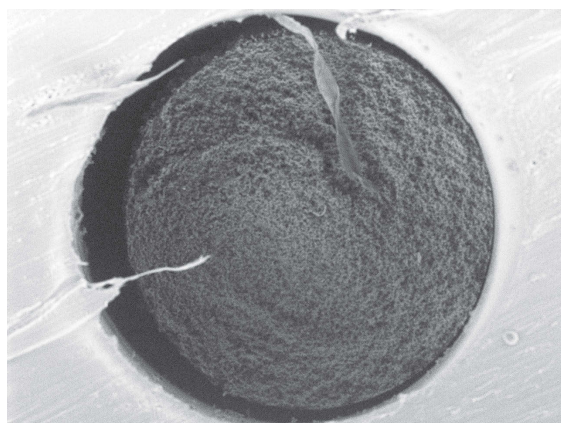
Querschnitt 4

500 µm



Querschnitt 5

500 µm

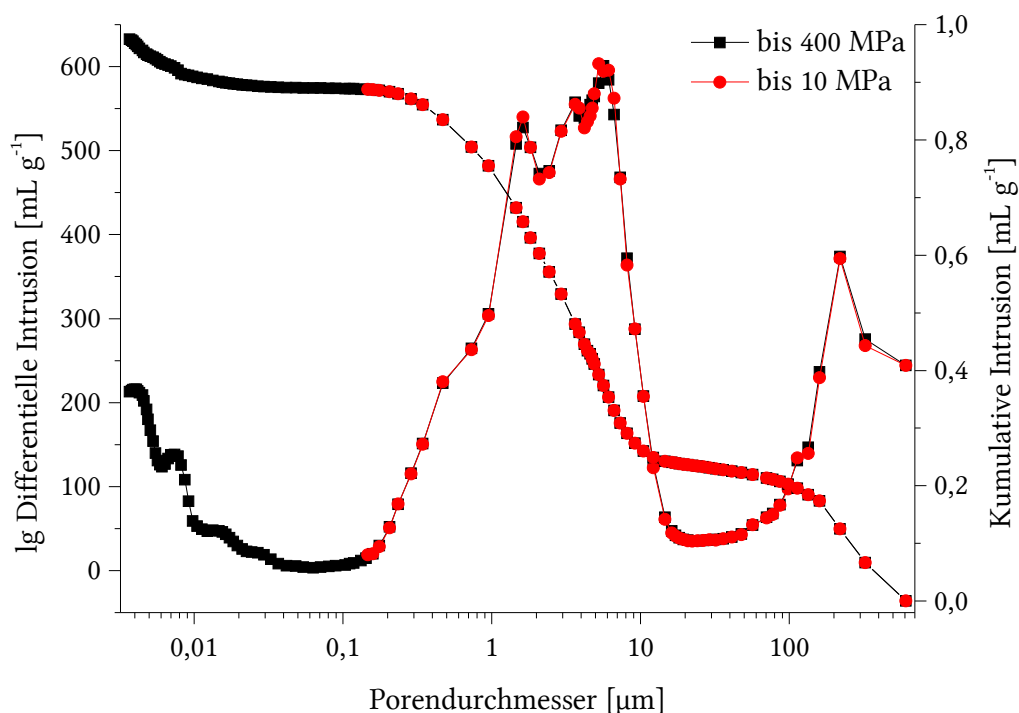


Querschnitt 6

500 µm

**Abbildung 4.12.** ESEM-Aufnahmen von Säulenquerschnitten einer längs zerteilten Monolithkapillarsäule, die mit  $\alpha$ -Tris(2,3-epoxypropyl)isocyanurat ( $\alpha$ -TEPIC) als Monomer und Bortrifluorid-Tetrahydrofuran-Komplex als Katalysator mit 65 Vol.-% Porogen (1,4-Dioxan/Isooctan (4:1)) in einem FEP-Schlauch (ID 0,8 mm, OD  $\frac{1}{16}$ "") in waagerechter Position mit optimierter Befüllungstechnik (vgl. Abbildung 4.11 auf Seite 97) *in situ* hergestellt wurde. Die Nummerierung erfolgte nach dem in Abbildung 3.1 auf Seite 64 illustrierten Schema.





**Abbildung 4.13.** Quecksilber-Intrusionskurve und Porengrößenverteilung von Monolithkapillarsäulen, die mit  $\alpha$ -Tris(2,3-epoxypropyl)isocyanurat ( $\alpha$ -TEPIC) als Monomer und Bortrifluorid-Tetrahydrofuran-Komplex als Katalysator mit 65 Vol.-% Porogen (1,4-Dioxan/Isooctan (4:1)) in einem FEP-Schlauch (ID 0,8 mm, OD  $\frac{1}{16}$ ") *in situ* hergestellt wurden.

Säulen konnten wegen der geringen Haftung an die FEP-Schläuche problemlos herausgedrückt werden, ohne sie bzw. die Porenstruktur dabei zu beschädigen. Der Monolith wurde für die Messung grob zerkleinert und die nach der Quecksilber-Intrusionskurve in Abbildung 4.13 vorhandenen über 100  $\mu\text{m}$  großen Poren entsprachen vermutlich den Zwischenräumen der Monolithbrocken, die im Niederdruck ebenfalls erfasst werden. Auf keiner Mikroskop-Aufnahme waren derlei große Poren, größer als ein Achtel des Kapillarinneendurchmessers, zu erkennen. Die erste Messung wurde mit Drücken bis 400 MPa durchgeführt, dabei ist ein Anstieg ab 150 MPa bzw. 0,01  $\mu\text{m}$  der schwarzen Quecksilber-Intrusionskurve zu erkennen.

Aus dieser Messung ergab sich eine Porosität von 60 % und eine Oberfläche von  $55 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ . Darauf folgende Gasadsorptionsmessungen erfassten jedoch keine Poren im Meso- oder Mikroporenbereich, sodass der erneute Anstieg der Quecksilber-Intrusionskurve auf eine Kompression des Materials zurückgeführt wurde. Für die Auswertung wurden deshalb nur die Daten bis 10 MPa berücksichtigt. Die Porosität blieb mit 55 % davon nahezu unverändert. Die Oberfläche reduzierte sich dadurch jedoch drastisch auf nur noch  $2 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ . Die Porengröße betrug 4  $\mu\text{m}$  und war mit der des TEPIC/BACM-Monoliths<sup>[192]</sup>,

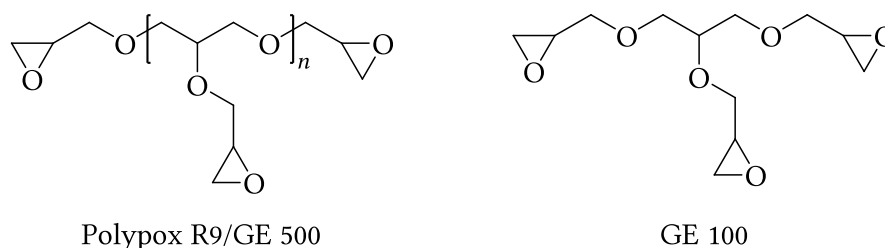
bei dem nach Quecksilber-Intrusionsporosimetriemessungen eine monomodale Porengrößenverteilung mit 3  $\mu\text{m}$  großen Poren vorlag, vergleichbar. Zwar war die Porosität des TEPIC/BACM-Monoliths mit ca. 80 % um das 1,5-fache höher, doch trotzdem betrug die spezifische Oberfläche, ermittelt durch Gasadsorption, wie beim TEPIC-Monolith lediglich ca.  $3 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$  [192].

FEP-Schläuche eigneten sich zwar, um die Phasenseparation verfolgen zu können, doch sind sie schlechte Haftvermittler, nicht druckstabil und zudem für die Verschraubungen an der HPLC-Anlage zu glatt. Die Befüllungs- und Verschluss Technik sollte deshalb auf Kapillaren, bestehend aus dem nicht transparenten Polyetheretherketon (PEEK), mit einem Innendurchmesser von 500  $\mu\text{m}$  übertragen werden, das sich durch Biokompatibilität sowie gute Temperatur-, Druck- und Chemikalienbeständigkeit auszeichnet [357]. Diese waren aber zu starr und ließen sich nicht mehr mit Nägeln dicht verschließen.

Die Versuche wurden an dieser Stelle mit TEPIC als Monomer nicht weitergeführt. Die Optimierung eines apparativen Aufbaus, um Monolithkapillarsäulen in Edelstahl- und/oder PEEK-Kapillaren bei 90 °C mit reproduzierbarer monolithischer Struktur herzustellen, erschien zu diffizil. Darüber hinaus wäre für eine notwendige Vergrößerung der Oberfläche eine Verkleinerung der Porengröße erforderlich gewesen. Die bisherigen Reaktionsbedingungen wären aufgrund der im Allgemeinen geringen Löslichkeit aber kaum zu verändern gewesen (vgl. Diplomarbeit [352]). Der kritischste Punkt war die erforderliche hohe Reaktionstemperatur, die auch unter Berücksichtigung der Arbeiten von Hosoya et al. mindestens 80 °C betragen musste und somit die als Porogene einsetzbaren Lösungsmittel limitierte.

### 4.3 Monolithsynthese mit GE 100 und GE 500

Die Monolithsynthesen wurden schließlich mit den von der Firma Raschig GmbH (Ludwigshafen) zur Verfügung gestellten Monomeren GE 100 und GE 500, deren Strukturen in Abbildung 4.14 angegeben sind, in Anlehnung an die Arbeiten von PESKOLLER et al. [13] weitergeführt. GE 100 ist ein Glyceroltriglycidylether, der bisher von zwei weiteren Gruppen für die Herstellung epoxidbasierter Monolithe durch Reaktionen mit Aminen verwendet wurde. In aktuellen Arbeiten von TALEBI et al. [4] wurde GE 100 mit Ethylendiamin in PEG 1000 und 1-Decanol als Porogenmischung bei 80 °C für 22 h in Quarzglaskapillaren (ID 100  $\mu\text{m}$ , OD 375  $\mu\text{m}$ ) polymerisiert und für die Trennung kleiner und großer Moleküle mit unterschiedlichen Flüssigchromatographietechniken eingesetzt. Von der Gruppe um IRGUM [195] wurde ein Glyceroltriglycidylether der Firma Polysciences Europe GmbH (Eppelheim) mittels Emulsionspolymerisation in Mischung mit



**Abbildung 4.14.** Strukturen der für die Monolithsynthese eingesetzten Monomere GE 100 und GE 500 sowie die Struktur des von PESKOLLER et al.<sup>[13]</sup> eingesetzten Monomers Polypox R9. Die Wiederholungseinheit  $n$  ist unbekannt und wurde für GE 500 mit  $n = 5$  als Orientierungswert angenommen.

weiteren Epoxidmonomeren ebenfalls bei 80 °C umgesetzt und der Monolith hinsichtlich seiner Struktur und Oberflächenfunktionalität untersucht. GE 500 ist wie das von PESKOLLER et al.<sup>[13]</sup> eingesetzte Monomer Polypox R9 von UPPC (Mietingen) im Vergleich ein höher funktioneller Polyglycidylether auf Basis von Polyglycerol, der in alle drei Ebenen verzweigt sein kann. Polyfunktionelle Glycidylether sind technische Produkte, die hauptsächlich als Vernetzer in Epoxidharzen eingesetzt werden<sup>[197]</sup>. Das bedeutet, dass, obwohl die Strukturen in Abbildung 4.14 für GE 500 und Polypox R9 identisch angegeben werden, es sich tatsächlich um unterschiedliche Mischungen handeln kann. Die Wiederholungseinheit  $n$  ist unbekannt und wurde für GE 500 aufgrund der Bezeichnung „500“ mit  $n = 5$  als Orientierungswert angenommen.

In der vorliegenden Arbeit wurden GE 100 und GE 500 in einer Autopolymerisation im Gegensatz zu TEPIC bei Raumtemperatur polymerisiert. Nach einem Porogenscreening wurde der Einfluss des Porogenanteils auf die Rigidität und die poröse Struktur von Monolithen, die mit GE 500 hergestellt wurden, untersucht. Mit einem ausgewählten Material wurden schließlich mit einem rekombinanten Protein A funktionalisierte Monolithkapillarsäulen und -disks zur Isolierung von IgG aus Kaninchenserum hergestellt.

#### 4.3.1 Porogenscreening

Für die Monolithsynthesen mit GE 100 und GE 500 musste zuerst ein Porogenscreening durchgeführt werden, um empirisch eine Mischung zu finden, mit der sich die Monomere jeweils mischten und die für das Polymer eine Phasenseparation induzierte. Häufig werden bei Monolithsynthesen mit bestimmten Monomermischungen bewährte Porogenmischungen eingesetzt<sup>[1]</sup>. In Anlehnung an die Arbeiten von PESKOLLER et al.<sup>[13]</sup> wurden deshalb für GE 100 und GE 500 als Porogenmischungen

**Tabelle 4.2.** Ergebnisse des Porogenscreenings mit Mischungen bestehend aus Toluol, 1,4-Dioxan (Dioxan) und Methyl-*tert*-butylether (MTBE), die jeweils mit 80, 60 und 40 Vol.-% eingesetzt wurden. Dabei bedeuten ✓ = Phasenseparation eingetreten und ✗ = keine Phasenseparation eingetreten.

Monomer	Toluol/MTBE (3:2)			Dioxan/Toluol (1:4)			Dioxan/MTBE (2:3)		
	80	60	40	80	60	40	80	60	40
GE 100	✓	✓	✗	✗	✗	✗	✓	✗	✗
GE 500	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✓	✓	✗

- Toluol/MTBE (3:2),
- 1,4-Dioxan/Toluol (1:4),
- 1,4-Dioxan/MTBE (2:3)

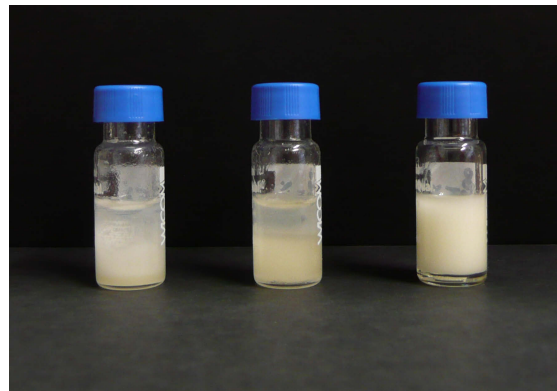
eingesetzt. Weil das Eintreten einer Phasenseparation nicht nur von der Zusammensetzung des Porogens sondern auch von dessen Anteil in der Polymerisationslösung abhängt, wurde zudem auch der Anteil mit 40, 60 und 80 Vol.-% variiert. Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass die Porosität maximal und idealerweise auch dem eingesetzten Porogenvolumenanteil entspricht, wäre mit einem geringeren Anteil als 40 Vol.-% die Porosität des Monoliths für eine chromatographische Anwendung zu gering und mit einem höheren Anteil als 80 Vol.-% der Monolith aller Voraussicht nach zu wenig vernetzt und dadurch nicht ausreichend rigide gewesen. Die Polymerisationen wurden mit Bortrifluoridetherat als Katalysator in Gewindegläschen bei Raumtemperatur durchgeführt. Fotos der Monolithe sind in Abbildung 4.15 gezeigt.

Die Monomere mischten sich mit allen Porogenen, die Phasenseparation setzte aber zu unterschiedlichen Zeitpunkten ein. Im Fall von GE 500 trat bei allen Ansätzen mit 80 Vol.-% Porogen unmittelbar nach dem Mischen ein Niederschlag auf. Mit GE 100 war eine sofortige Trübung nur in der Mischung Toluol/MTBE mit 80 Vol.-% zu beobachten, alle anderen Lösungen blieben klar. Mit dieser Porogenmischung und GE 100 war die Polymerisation bereits nach 60 min bei allen Ansätzen beendet und die Phasenseparation bei denen mit 80 Vol.-% und 60 Vol.-% Porogen eingetreten. Die Polymerisationen von GE 100 in der Mischung 1,4-Dioxan/Toluol mit 80 und 60 Vol.-% waren nach 120 min und alle anderen Reaktionen erst nach weiteren Stunden beendet. Bei den Ansätzen mit GE 500 trat generell nach 60-120 min keine erkennbare Veränderung der Trübung bzw. Phasenseparation mehr ein. Nur bei Lösungen von GE 500 in Toluol/MTBE blieben Porogenüberstände zurück. Aus den in Tabelle 4.2 zusammengefassten Ergebnissen geht hervor, dass eine vollständige Phasenseparation im Sinne eines harten, weißen Monolithblocks nur bei den folgenden Ansätzen eintrat:

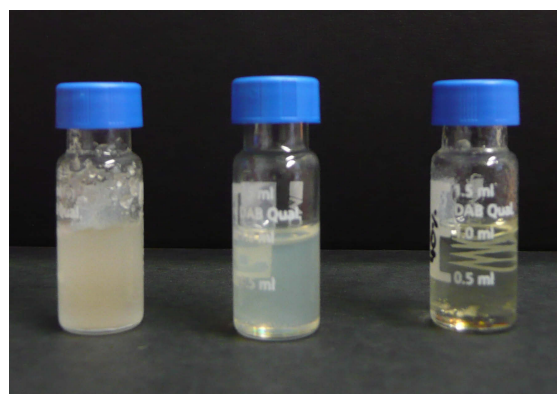
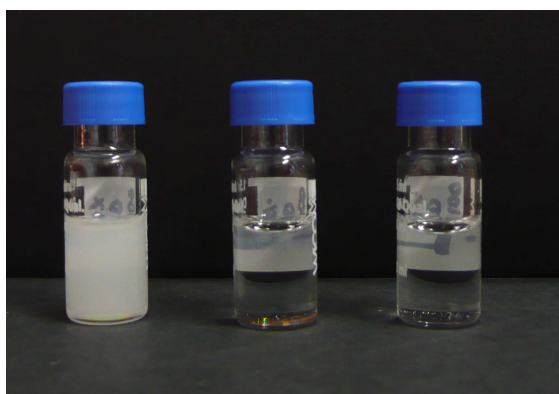
**A**

**B**

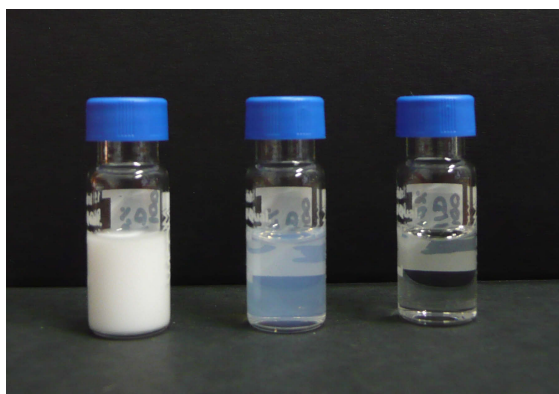
Toluol/MTBE (3:2)



1,4-Dioxan/Toluol (1:4)



1,4-Dioxan/MTBE (2:3)



**Abbildung 4.15.** Monolithblöcke, die mit (A) GE 100 bzw. (B) GE 500 als Monomer und 1,25 Vol.-% Bortrifluoridetherat (1:10) als Katalysator in drei verschiedenen Porogenmischungen hergestellt wurden. Die Porogenmischungen wurden jeweils mit 80, 60 und 40 Vol.-% (von links nach rechts) eingesetzt.

- GE 100
  - Toluol/MTBE (80 Vol.-%),
  - Toluol/MTBE (60 Vol.-%),
  - 1,4-Dioxan/MTBE (80 Vol.-%),
- GE 500
  - 1,4-Dioxan/MTBE (80 Vol.-%),
  - 1,4-Dioxan/MTBE (60 Vol.-%).

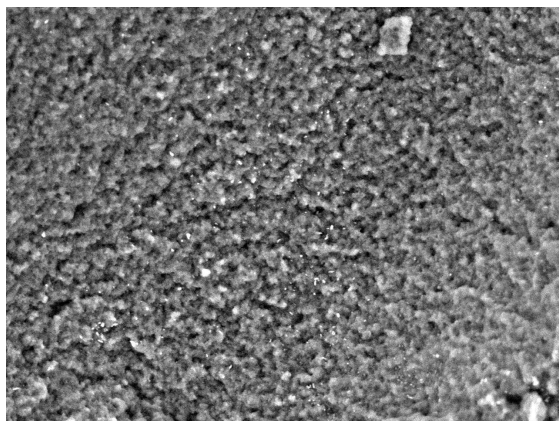
Auffallend war, dass eine Phasenseparation bei beiden Monomeren erst mit einem Anteil von mindestens 60 bzw. 80 Vol.-% eintrat. Und obwohl sich durch Polymerisation beider Monomere ein Polyethernetzwerk ausbildete, waren die geeigneten Porogenmischungen für GE 100 und GE 500 ähnlich aber nicht identisch. Eine Erklärung ist zum einen die unterschiedliche Polarität der Monomere und folglich auch der Polymere. Daneben wird auch der unterschiedliche Vernetzungsgrad aufgrund ungleich hoher Epoxidfunktionalitäten pro Monomermolekül eine wesentliche Ursache für ein unterschiedliches Präzipitationsverhalten gewesen sein. Die Mischung 1,4-Dioxan/Toluol führte mit keinem Monomer zu einem geeigneten Monolith. Außerdem schien Toluol für die Monolithsynthese mit GE 500 im Gegensatz zu der mit GE 100 kein geeignetes Coporogen in den eingesetzten Mischungsverhältnissen zu sein. Weder in Mischungen mit 1,4-Dioxan noch mit MTBE trat eine vollständige Phasenseparation ein. Mit GE 100 trat sie hingegen mit der Mischung Toluol/MTBE mit Porogenanteilen von 80 und 60 Vol.-% ein. Die Mischung 1,4-Dioxan/MTBE führte mit beiden Monomeren zu phasenseparierten Monolithen. Die Ergebnisse stimmten somit mit der These von ŠVEC<sup>[1]</sup> aus seiner Veröffentlichung, in der er feststellt „The choice of porogens for the preparation of porous polymer monoliths remains an art rather than science“, überein.

Materialien, die nicht phasenseparierten, sondern nach der Polymerisation als transparente Blöcke vorlagen, beinhalteten zu kleine Poren und hätten als stationäre Phase zu hohe Gegendrucke verursacht bzw. wären für Eluenten undurchlässig gewesen. Die als Trägermaterial in Frage kommenden Materialien reduzierten sich deshalb auf die vollständig phasenseparierten. Sie wurden getrocknet und ihre Morphologie mittels ESEM untersucht.

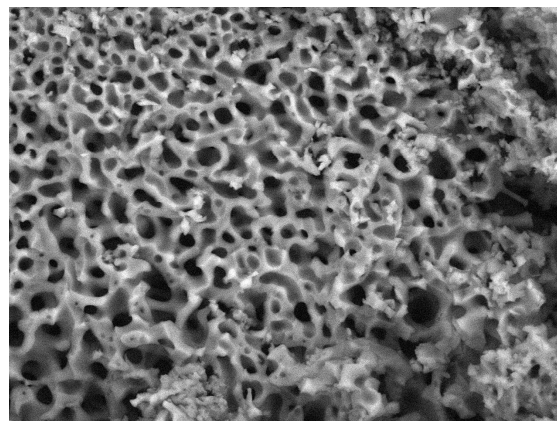
Die Morphologien unterschieden sich dabei je nachdem mit welcher Porogenmischung die Monolithe bzw. bei gleicher Mischung mit welchem Porogenanteil sie hergestellt wurden. Mit GE 100 ergab die Mischung 1,4-Dioxan/MTBE selbst bei einem Porogenanteil von 80 Vol.-%, wie in Abbildung 4.16 (A) zu erkennen, eine dichte Struktur, die keine



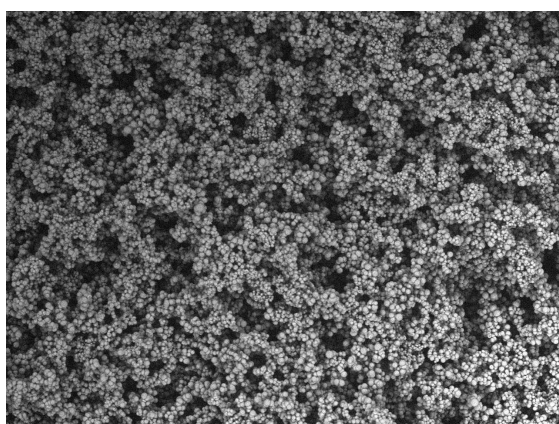
**A**



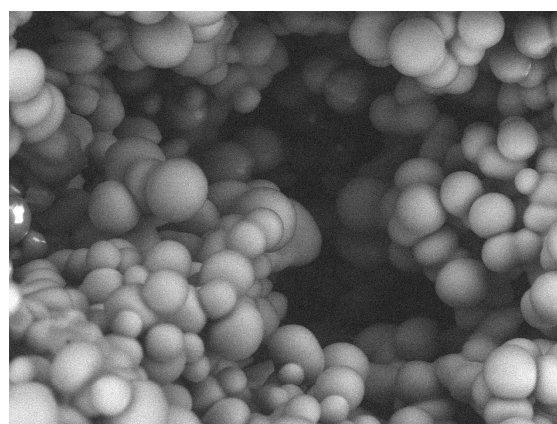
Dioxan/MTBE (80 Vol.-%) 50 µm



Toluol/MTBE (60 Vol.-%) 50 µm

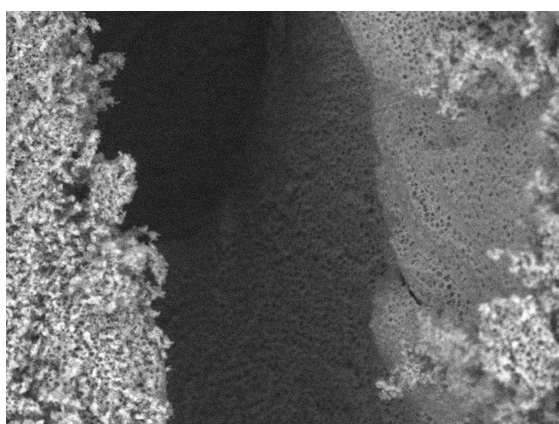


Toluol/MTBE (80 Vol.-%) 500 µm



Toluol/MTBE (80 Vol.-%) 50 µm

**B**

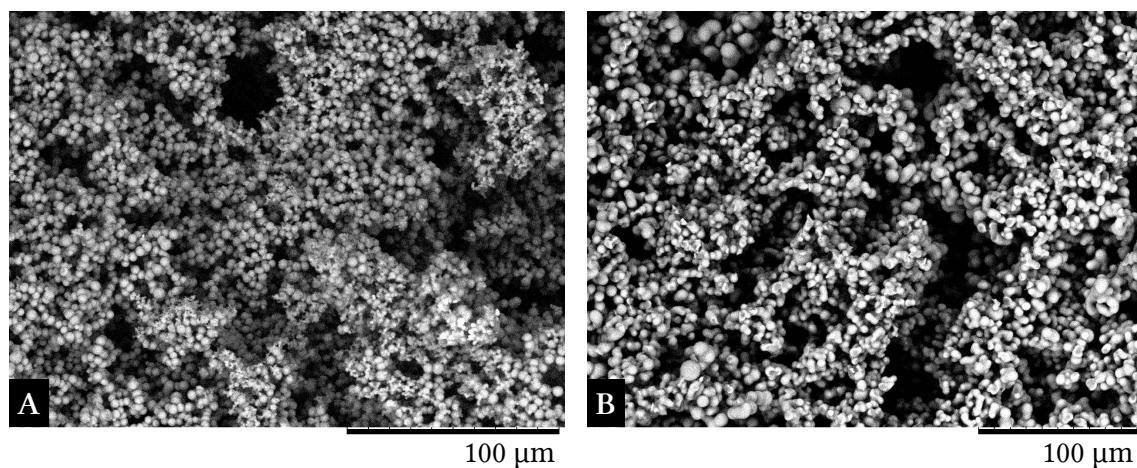


Dioxan/MTBE (60 Vol.-%) 100 µm



Dioxan/MTBE (80 Vol.-%) 200 µm

**Abbildung 4.16.** ESEM-Aufnahmen von Monolithen, die mit dem Monomer (A) GE 100 oder (B) GE 500 und 1,25 Vol.-% Bortrifluoridetherat (1:10) als Katalysator in verschiedenen Porogenmischungen (wobei 1,4-Dioxan (Dioxan), Methyl-*tert*-butylether (MTBE)) mit unterschiedlichen Volumenanteilen hergestellt wurden.



**Abbildung 4.17.** ESEM-Aufnahmen von Monolithen, die mit (A) **GE 100** als Monomer in Toluol/Methyl-*tert*-butylether (MTBE) (3:2, 80 Vol.-%) als Porogen und 1,25 Vol.-% Bortrifluoridetherat (1:2) als Katalysator bzw. die mit (B) **GE 500** als Monomer in 1,4-Dioxan/Methyl-*tert*-butylether (2:3, 80 Vol.-%) als Porogen und 1,25 Vol.-% Bortrifluoridetherat (1:2) als Katalysator hergestellt wurden.

Makroporen aufwies. Eine korallenartige und makroporöse Struktur wies hingegen der Monolith, der in 60 Vol.-% Toluol/MTBE hergestellt wurde, auf. Durch Steigerung des Anteils von 60 auf 80 Vol.-% lag eine homogene aus globulären Clustern zusammengesetzte Struktur mit einem vernetzten Porensystem vor.

Von dem Monolith, der mit GE 500 in der Mischung 1,4-Dioxan/MTBE mit einem Anteil von 60 Vol.-% hergestellt wurde, ist in Abbildung 4.16 (B) eine Aufnahme einer durch den Schnitt entstandene Spalte gezeigt. Es war zwar eine poröse Struktur zu erkennen, in der die Poren aber als geschlossenes System vorlagen und kein Porennetzwerk bildeten. Wie bei GE 100 in Toluol/MTBE ergab die Steigerung des Porogenanteils von 60 Vol.-% auf 80 Vol.-% eine erhebliche Änderung der Morphologie. Auch hier wurde sie schließlich globulär und wies vernetzte Porenkanäle auf. Die Struktur war aber im Vergleich zu der von GE 100 in Toluol/MTBE hinsichtlich der Clustergrößen weniger homogen.

Nach dem Porogenscreening und der anschließenden Strukturuntersuchung ergaben sich zwei geeignete Mischungen für die Herstellung von Monolithen:

- GE 100 in Toluol/MTBE (3:2) mit 80 Vol.-%,
- GE 500 in 1,4-Dioxan/MTBE (2:3) mit 80 Vol.-%.

Als Katalysator wurde bei allen Ansätzen bisher Bortrifluoridetherat 1:10 in 1,4-Dioxan verdünnt und mit einem Anteil von 1,25 Vol.-% eingesetzt. Mit geringerer Katalysatorkonzentration (1:12, 1:14, 1:16, 1:18, mit 1,25 Vol.-%) trübten sich die Ansätze mit GE 100,



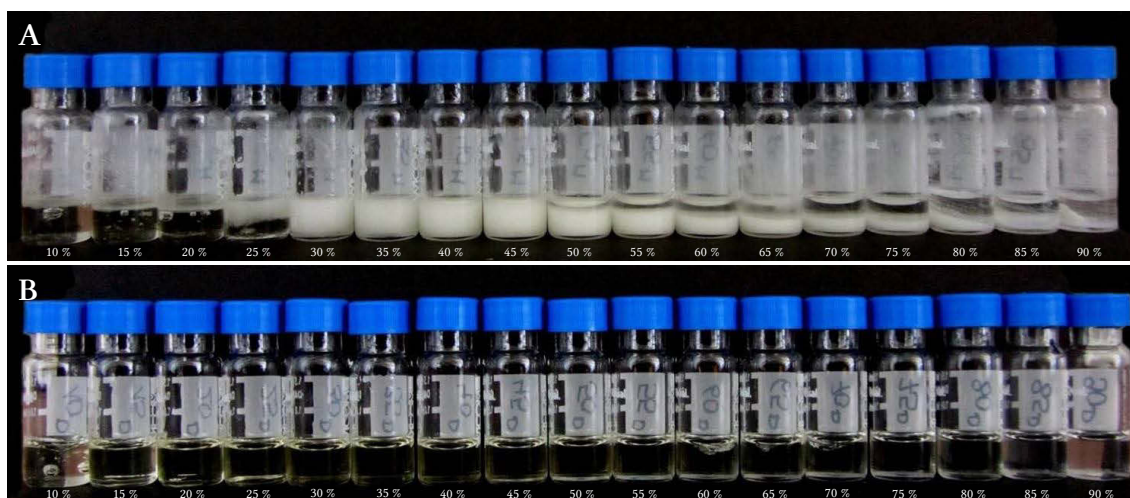
ein Feststoffblock bildete sich aber nicht, die Ansätze blieben flüssig. Mit GE 500 polymerisierten die Ansätze zu Feststoffen, wurden aber mit zunehmender Katalysatorverdünnung weicher und die Porogenüberstände nahmen zu. Bei höherer Katalysatorkonzentration (1:2, mit 1,25 Vol.-%) trat die Phasenseparation wie erwartet schneller ein, die Monolithe wiesen wider Erwarten aber keine merklich härtere Konsistenz auf. Auf den ESEM-Aufnahmen in Abbildung 4.17 war zudem auch keine Veränderung der Porengröße und Struktur zu erkennen. Bortrifluoridetherat wurde deshalb für weitere Monolithsynthesen weiterhin 1:10 verdünnt eingesetzt. Eine Polymerisationslösung, bei der sofort nach dem Mischen Polymer ausflockte, hätte später bei der Herstellung von Monolithsäulen bzw. -disks bei der Überführung der Lösung zur Blockierung der Kartuschen führen können.

### 4.3.2 Variation des Porogenvolumenanteils

Im Folgenden wurden Monolithsynthesen nur noch mit GE 500 als Monomer durchgeführt. Für GE 500 sprach die der Struktur nach höhere Funktionalität an Epoxidgruppen, die sowohl für die Polymerisation als auch für die Funktionalisierung gebraucht wurden. Nachdem sich im Porogenscreening die Mischung 1,4-Dioxan/MTBE (2:3) als am geeignetsten erwiesen hatte, wurde nun der minimale für eine Phasenseparation notwendige Porogenanteil ermittelt und der Einfluss des Porogenanteils auf die Porosität, Porengröße und Härte untersucht. Dafür wurde der Porogenanteil von 80 auf 70 Vol.-% in ein Prozent-Schritten reduziert. Die Analyse der porösen Eigenschaften erfolgte durch Quecksilber-Intrusionsporosimetriemessungen und die Morphologie wurde mittels ESEM visualisiert. Die Härte wurde nach SHORE A bestimmt.

#### A Morphologie und Porosimetrie

Monolithsynthesen, bei denen entweder nur MTBE oder nur 1,4-Dioxan als Porogene mit steigendem Anteil von 10 bis 90 Vol.-% in fünf Prozent-Schritten eingesetzt wurden, zeigten, dass MTBE für das Polymer das schlechtere Lösungsmittel war. Aufnahmen der Ansätze sind in Abbildung 4.18 gezeigt. Mit MTBE als Porogen (**A**) trat eine Phasenseparation ab einem Anteil von 30 Vol.-% ein und ab einem Anteil von 50 Vol.-% blieben mit steigendem Anteil immer mehr Überstände zurück. Eine Phasenseparation mit MTBE trat demnach bei einem Volumenverhältnis von GE 500 zu MTBE im Bereich von 2,3-1,2 ein. Im Gegensatz dazu trat mit 1,4-Dioxan als Porogen (**B**) bei keinem Ansatz eine Phasenseparation ein, aber alle Ansätze polymerisierten und es blieben keine Porogenüberstände zurück. Durch den Dioxananteil in der Porogenmischung beider Lösungsmittel (1,4-Dioxan/MTBE (2:3)) waren 50 Vol.-% der minimale Porogenanteil, ab dem eine Pha-

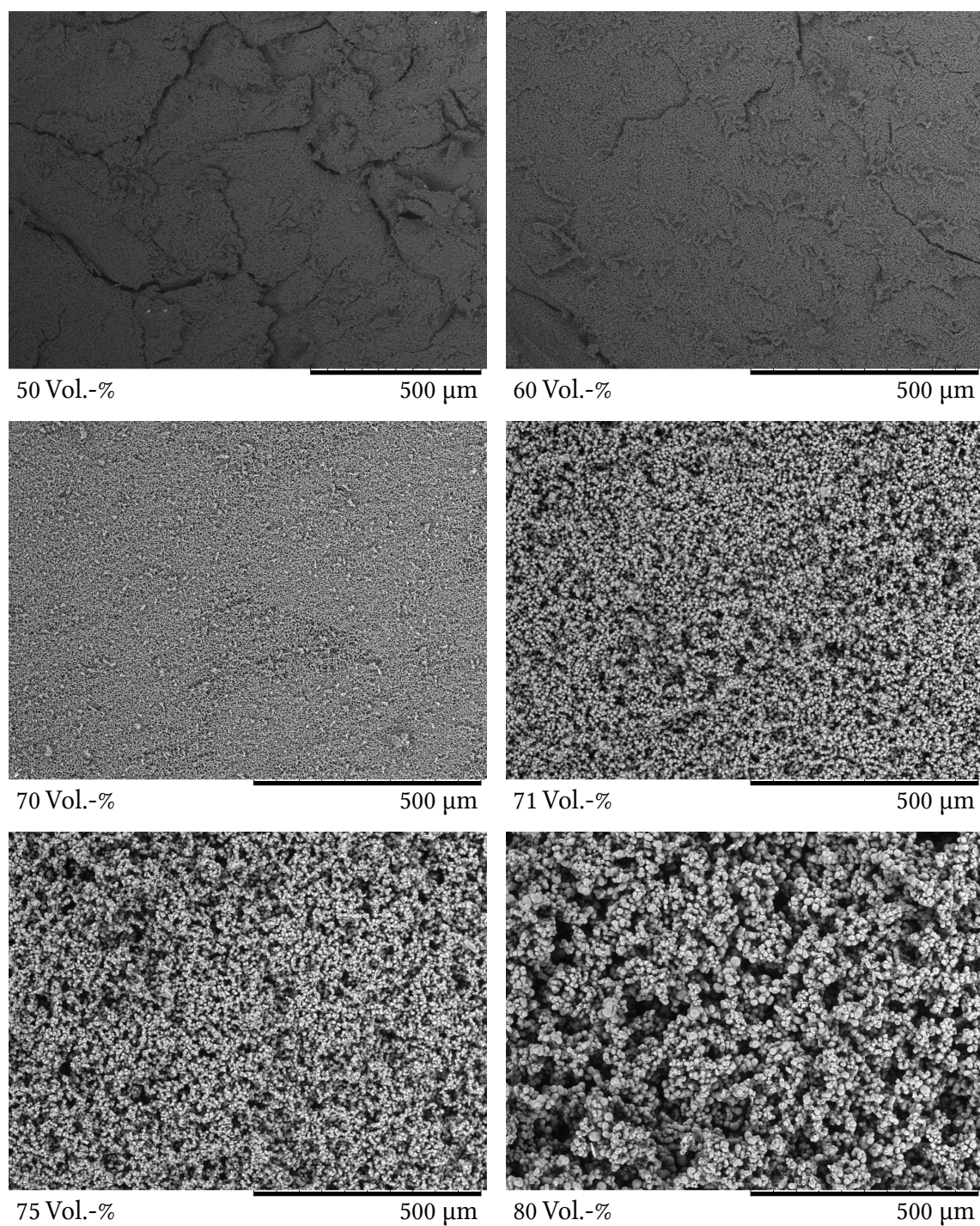


**Abbildung 4.18.** Ansätze mit **GE 500** als Monomer, 1,25 Vol.-% Bortrifluoridetherat (1:10) als Katalysator in (A) Methyl-*tert*-butylether (MTBE) bzw. (B) 1,4-Dioxan als Porogen mit variierendem Volumenanteil.

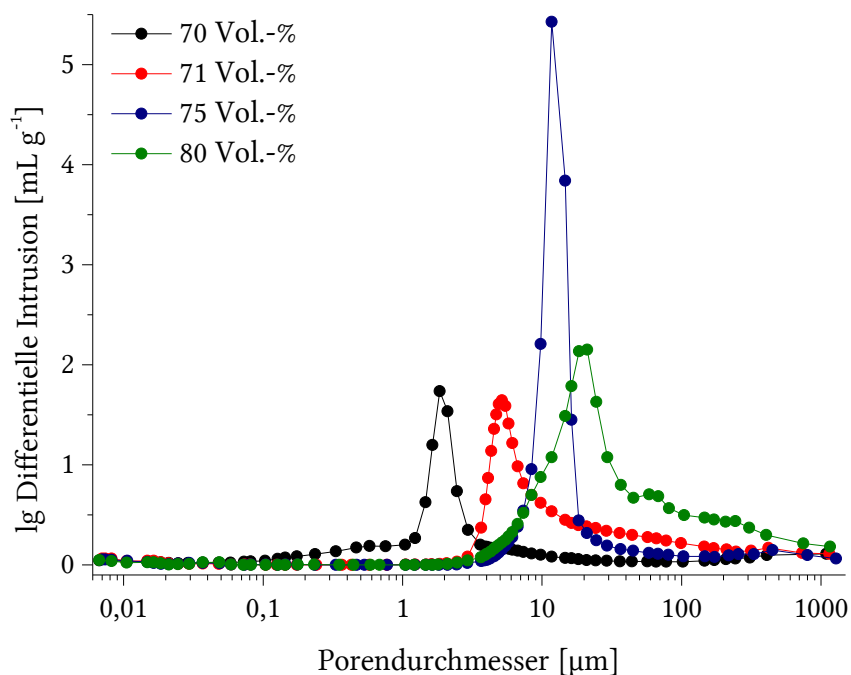
senseparation erst induziert wurde. Das Volumenverhältnis GE 500 zu MTBE musste demnach mindestens 1,7 betragen.

Die ESEM-Aufnahmen in Abbildung 4.19 zeigten, dass bei Monolithen, die mit 50 und 60 Vol.-% hergestellt wurden, ein geschlossenes Porensystem vorlag und sich die Morphologie ab 70 bzw. 71 Vol.-% zu einer globulären und makroporösen Struktur veränderte. Mit steigendem Porogenanteil nahm die Porengröße wie erwartet zu.

Die Porosität und Porengröße wurden erst für Ansätze ab 70 Vol.-% bestimmt. Für Monolithe, die mit weniger Porogenanteil hergestellt wurden, wären die Ergebnisse aufgrund des geschlossenen Porensystems, das für das Quecksilber unzugänglich gewesen wäre, nicht aussagekräftig gewesen. Die Ergebnisse wurden in Tabelle 4.3 zusammengestellt und die Porengrößenverteilungen graphisch in Abbildung 4.20 (vgl. Quecksilber-Intrusionskurven in Abbildung A.8 (A) auf Seite 158) dargestellt. Wie schon auf den ESEM-Aufnahmen erkennbar ist, nahmen Porengröße und Porosität mit steigendem Porogenanteil zu, wobei die Differenz zwischen eingesetztem Porogenanteil und ermittelter Porosität ca. 10 % betrug. Eine Ausnahme war der 70 Vol.-%-Monolith, bei dem die Abweichung, vermutlich wegen eines noch teilweise vorhandenen geschlossenen Porensystems, 20 % betrug. Bei allen Proben lag eine weitgehend monomodale Porengrößenverteilung vor. Die Porengröße verzehnfachte sich bei Steigerung des Porogenanteils um ca. 10 Vol.-%, wohingegen sich die spezifische Oberfläche gleichzeitig halbierte. Die größte spezifische Oberfläche von  $9 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$  des 70 Vol.-%-Monoliths ist im Vergleich zu  $89 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ , die z. B. Luo et al. [340] mit GMA/EDMA-Monolithen erhielten, gering. Die epoxidbasierten Monolithe, die TALEBI et al. [4] mit GE 100 herstellten, wiesen hingegen



**Abbildung 4.19.** ESEM-Aufnahmen von Monolithen, die mit **GE 500** als Monomer und 1,25 Vol.-% Bortrifluoridetherat (1:10) als Katalysator in 1,4-Dioxan/Methyl-*tert*-butylether (MTBE) (2:3) als Porogen mit variierendem Volumenanteil hergestellt wurden.



**Abbildung 4.20.** Porengrößenverteilungen (0,0007-200 MPa) von Monolithen, hergestellt mit **GE 500** als Monomer und 1,25 Vol.-% Bortrifluoridetherat (1:10) als Katalysator in 1,4-Dioxan/Methyl-*tert*-butylether (MTBE) (3:2) als Porogen mit variierendem Volumenanteil.

**Tabelle 4.3.** Poröse Eigenschaften von Monolithen, hergestellt mit **GE 500** als Monomer und 1,25 Vol.-% Bortrifluoridetherat (1:10) als Katalysator in 1,4-Dioxan/Methyl-*tert*-butylether (MTBE) (3:2) als Porogen mit variierendem Volumenanteil.

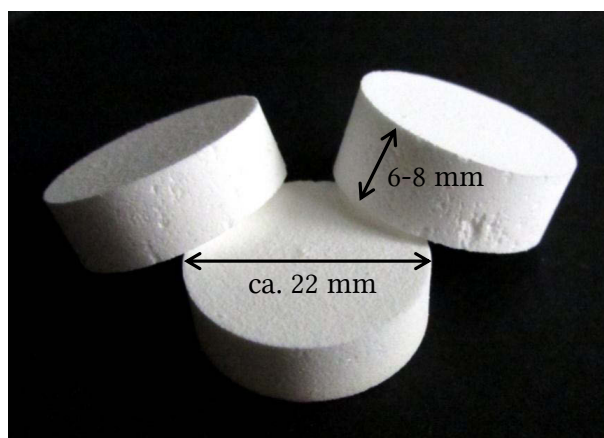
Porogenanteil [Vol.-%]	Porosität [%]	Porengröße [μm]	spezifische Oberfläche [m <sup>2</sup> g <sup>-1</sup> ]	Dichte [g mL <sup>-1</sup> ]
70	51 ± 3	1,9 ± 0,1	9,3 ± 0,3	0,67 ± 0,04
71	57 ± 3	5,2 ± 0,1	7,9 ± 0,2	0,57 ± 0,02
72	59 ± 4	5,5 ± 0,1	7,7 ± 0,2	0,56 ± 0,04
73	62 ± 3	5,8 ± 0,1	9,3 ± 0,3	0,53 ± 0,02
74	65 ± 3	9,8 ± 0,2	7,3 ± 0,2	0,47 ± 0,02
75	66 ± 3	11,7 ± 0,2	6,7 ± 0,2	0,45 ± 0,02
76	66 ± 3	9,8 ± 0,2	6,5 ± 0,2	0,47 ± 0,02
77	69 ± 3	11,7 ± 0,2	6,5 ± 0,2	0,46 ± 0,02
78	67 ± 3	14,7 ± 0,3	6,8 ± 0,2	0,43 ± 0,02
79	69 ± 3	18,3 ± 0,4	7,9 ± 0,2	0,43 ± 0,02
80	69 ± 3	21,0 ± 0,4	5,2 ± 0,1	0,41 ± 0,01

sowohl eine geringere Porosität mit 42-62 % als auch kleinere Porengrößen im Bereich von 0,7-1,7  $\mu\text{m}$  auf. Und trotz kleinerer Poren waren auch die erzielten spezifischen Oberflächen mit 1-4  $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$  geringer.

Interessant ist der Vergleich des 80 Vol.-%-Monoliths mit dem aus den Arbeiten von PESKOLLER et al., der ebenfalls mit 80 Vol.-% der Porogenmischung 1,4-Dioxan/MTBE (2:3), gleichem Katalysator sowie gleicher Katalysatormenge und mit dem zu GE 500 strukturalähnlichen Monomer Polypox R9 hergestellt wurde. Obwohl sich die Materialien daher in ihren porösen Eigenschaften sehr ähnlich sein sollten, unterschieden sie sich neben einer zumindest gleich hohen Porosität (71 % zu 69 %) erheblich in ihrer Porengröße. Diese betrug mit Polypox R9 1  $\mu\text{m}$  und war somit um den Faktor 20 kleiner. Eine vergleichbare Porengröße von 20  $\mu\text{m}$  erhielten sie mit der Porogenmischung Toluol/MTBE (3:2), die im Gegenteil für GE 500 mit keinem Porogenanteil eine geeignete Mischung war. Ein Vergleich der spezifischen Oberfläche ist nicht möglich, weil in der Veröffentlichung von PESKOLLER et al. dazu keine Angabe gemacht wurde. Diese Unterschiede sprechen dafür, dass, wie bereits erwähnt, es sich bei Polypox R9 und dem in dieser Arbeit eingesetzten GE 500 um unterschiedliche Mischungen handelte, mit denen unter gleichen Reaktionsbedingungen synthetisierte Monolithe unterschiedliche poröse Eigenschaften besaßen bzw. sich auch unterschiedliche Porogenmischungen für die Synthese eigneten.

## **B Härtebestimmung nach SHORE A**

Die Härtmessung nach SHORE A ist ein Verfahren zur Bestimmung der Härten von Elastomeren. Die Messung der Härte von Monolithen ist bisher nur durch Bestimmung der Kompressibilität, d. h. durch Messung ihrer Gegendrücke, beschrieben. Um aber die tatsächliche Härte bzw. Rigidität eines monolithischen Materials quantifizieren zu können, wurde nach einem geeigneten Verfahren gesucht und aufgrund einer zu Elastomeren ähnlichen Konsistenz die Bestimmung nach SHORE A auf Monolithe angewendet. Es wurden die Härten von Monolithen, die mit 60, 70, 75 und 80 Vol.-% hergestellt wurden, bestimmt. Dafür wurden Monolithblöcke mit einem Durchmesser von ca. 22 mm in Gewindegläsern mit einem Durchmesser von 27,5 mm hergestellt, die in 6-8 mm dicke Scheiben zersägt wurden. Ein Foto von ihnen ist in Abbildung 4.21 gezeigt. Die Messungen wurden pro Monolithprobe mit mehreren Scheiben und sowohl am Rand als auch mittig gemessen. Die Werte schwankten dabei in Abhängigkeit der vermessenen Scheibe und der Messstelle, was auf Inhomogenität des Materials sowohl in der Länge als auch in der Breite schließen ließ. Die Schwankungen betrugen beim Monolith, der mit 60 Vol.-% hergestellt wurde, 13 Einheiten. Bei den anderen drei Blöcken schwankten die Härten um 5-9 Einheiten. Die Härte der Monolithe nahm mit steigendem Porogenanteil, mit



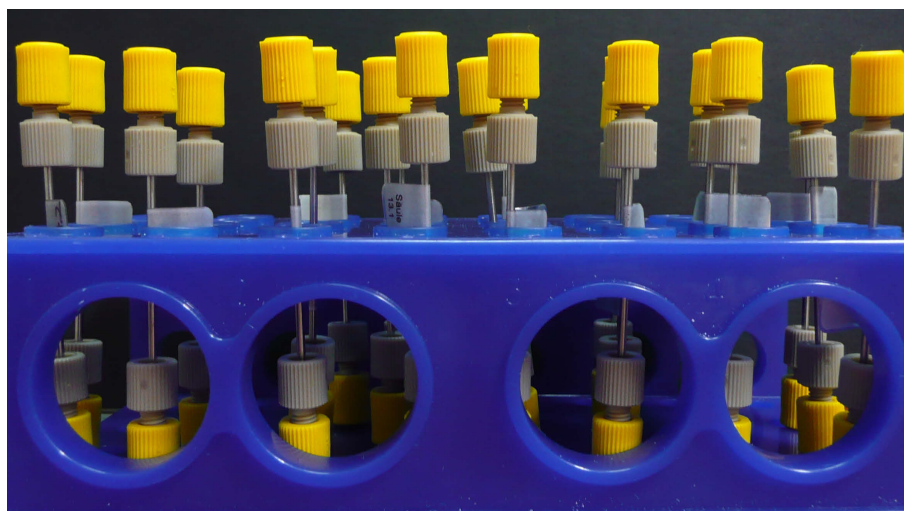
**Abbildung 4.21.** Hergestellte Monolithscheiben für die Härtemessung nach SHORE A.

dem sie hergestellt wurden, erwartungsgemäß ab. Der 60 Vol.-%- und 70 Vol.-%-Monolith wiesen beide im Mittel eine Härte von 51 auf. Die Härte nahm dann deutlich ab. Die des 75 Vol.-%-Monoliths betrug im Mittel 39 und die des 80 Vol.-%-Monoliths nur noch 11. Aus diesen Messungen geht zusammen mit den Porositätsuntersuchungen hervor, dass ein steigender Porogenanteil zwar zu höheren Porositäten und größeren Durchflusssporen führte, die für eine gute Permeabilität der Monolithe sorgen, gleichzeitig aber auch die Reduzierung der Rigidität durch eine geringere Vernetzung zur Folge hatte.

### 4.3.3 Präparation von Kapillarsäulen und Disks

Für die Herstellung monolithischer Kapillarsäulen wurde von den Mischungen mit 70-80 Vol.-% Porogen der Ansatz mit GE 500 in 75 Vol.-% 1,4-Dioxan/MTBE (2:3) gewählt. Diese Monolithe kombinierten eine hohe Porosität von 66 %, 12  $\mu\text{m}$  großen Poren, eine spezifische Oberfläche von ca. 7  $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$  und eine mittlere SHORE-A-Härte von 39. Materialien, hergestellt mit geringerem bzw. höherem Porogenanteil, wären weniger porös bzw. weicher gewesen. Die Monolithkapillarsäulen wurden in Edelstahlkapillaren mit einem Innendurchmesser von 500  $\mu\text{m}$  und einer Länge von ca. 8 cm *in situ* hergestellt. Nach Mischung der Reaktionslösung in einem Gewindegläschen ( $V = 2 \text{ mL}$ ) wurde die Kapillare durch das Septum der Kappe gestochen, die sich durch einen Überdruck ohne äußere Druckeinwirkung füllte. Sie wurde daraufhin an beiden Enden mit Anschlussstücken und einer Kappe verschraubt und senkrecht, damit das Polymer sedimentieren konnte, bei Raumtemperatur, wie in Abbildung 4.22 gezeigt, gelagert. Nach Öffnung der Säulen war in der Regel an beiden Enden kein phasenseparierter Monolith vorhanden, sodass die Kapillaren so lange gekürzt wurden, bis der Monolith zu erkennen war. Damit die Säulen nach Kürzung noch an die HPLC-Anlage angeschlossen werden konnten,

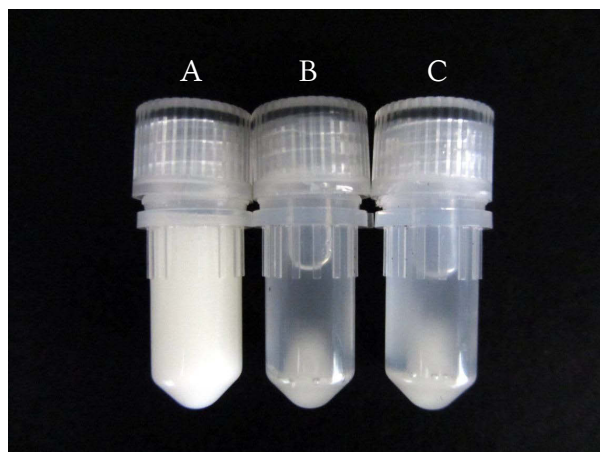




**Abbildung 4.22.** Lagerung von Kapillarsäulen während der Präparation. Beide Enden wurden mit Anschlüssen und Kappen verschraubt.

mussten sie für die Präparation erfahrungsgemäß auf ca. 8 cm zugeschnitten werden. Weil die Säulen stets, eventuell aufgrund einer Schrumpfung, gekürzt werden mussten und die Monolithe nicht auf die Bildung von Blasen oder Spalten in der Edelstahlsäule untersucht werden konnten, wurden als zweites Format Monolithdisks hergestellt. Das Diskformat ermöglicht zudem höhere Flussraten bei gleichbleibendem oder sogar niedrigerem Gegendruck als bei Verwendung von Säulen, wodurch wiederum die Effizienz gesteigert wird<sup>[358]</sup>. Anfänglich wurde die Idee verfolgt, dickere Monolithsäulen herzustellen und diese in entsprechender Dicke zuzuschneiden. Dazu wurden Tests mit PVC-Schläuchen durchgeführt, die in einen Monolithblock einpolymerisiert werden sollten und aus denen sich der Monolith leicht herausdrücken ließe. Der Schlauch wurde zum einen sofort nach dem Mischen und zum anderen zum Zeitpunkt des Eintretens der Phasenseparation zur Polymerisationslösung gegeben. In beiden Fällen störte der Schlauch die Polymerisation, sodass eine vollständige Phasenseparation ausblieb. Auch bei Einsatz von Silikonschläuchen blieb die Phasenseparation aus. Ursache könnten die in Kunststoffschläuchen vorhandenen Weichmacher gewesen sein, die durch die Lösungsmittel 1,4-Dioxan und MTBE herausgelöst wurden. Ein Versuch, in dem dieselbe Polymerisationslösung einmal ohne Schlauch und zweimal mit PVC-Schläuchen polymerisiert wurde, bestätigte, wie in Abbildung 4.23 zu sehen, eindeutig, dass bei der Lösung ohne Schlauch wie erwartet die Phasenseparation eintrat (**A**) und sie bei Anwesenheit des Schlauchs ausblieb (**B + C**).

Der Ansatz, die Monolithdisks aus einer Säule zuzuschneiden, wurde deshalb verworfen. Sie wurden daraufhin in ihrem Endformat *in situ* polymerisiert. Als Kartusche diente ein Inline-Solvent-Filter, der normalerweise, hinter einer HPLC-Säule angeschlossen, als Fil-

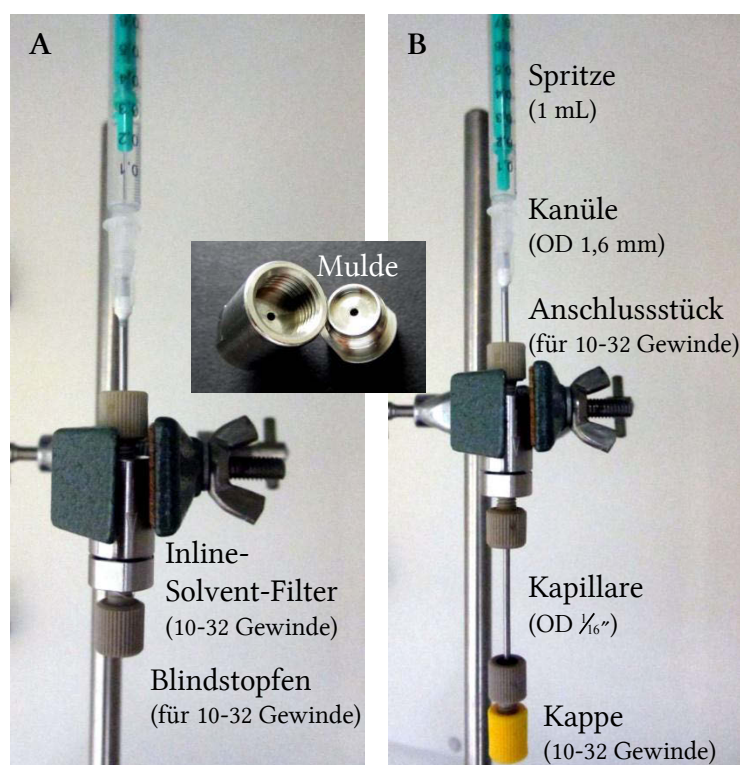


**Abbildung 4.23.** Drei Ansätze mit identischer Polymerisationslösung bestehend aus GE 500 als Monomer mit 1,25 Vol.-% Bortrifluoridetherat (1:10) in 75 Vol.-% Porogen (1,4-Dioxan/Methyl-*tert*-butylether (MTBE) (2:3)), (A) phasenseparierter Ansatz ohne PVC-Schlauch, (B + C) Ansätze mit PVC-Schläuchen, bei denen eine Phasenseparation ausblieb.

ter dient. Die enthaltene Fritte wurde entfernt und die Monolithdisks in der freien Mulde ( $7 \times 2$  mm), wie sie in Abbildung 4.24 zu sehen ist, polymerisiert. Der Filter bot die Vorteile, dass er fest verschraubbar war und mit Standard HPLC-Anschlüssen direkt an die Anlage angeschlossen werden konnte. Außerdem war er schon dahingehend optimiert, dass der Fluss sich auf die gesamte Oberfläche der Monolithdisk verteilte.

Für die Befüllung wurde die Reaktionsmischung, die in einem Gewindegläschen angesetzt wurde, mit einer Spritze aufgezogen. Die Spritze konnte mit dem Inline-Solvent-Filter mit Hilfe eines Anschlussstücks und durch Verwendung einer 1,6 mm ( $1/16''$ ) dicken Kanüle verschraubt werden. Die Lösung wurde oben eingespritzt, bis sie unten herauströpfte. Daraufhin wurde der Filter mit einem Blindstopfen verschlossen und der Aufbau, wie er in Abbildung 4.24 (A) abgebildet ist, belassen. Das Eintreten der Phasenseparation konnte anhand der in der Spritze zurückgelassenen Lösung beobachtet werden. Etwa die Hälfte aller präparierten Monolithdisks wiesen mittig an der Stelle der Durchgangsbohrung, wie in Abbildung 4.25 (A) zu erkennen, ein Loch auf. Durch das Einschrauben des Blindstopfens konnte Flüssigkeitsvolumen an der Stelle verdrängt worden sein. Dies wurde vermieden, indem an das untere Ende des Filters nicht direkt der Blindstopfen eingeschraubt, sondern zunächst eine Kapillare, die schließlich, wie in Abbildung 4.24 (B) gezeigt, mit einer Kappe verschlossen wurde. Derart hergestellte Monolithdisks wiesen keine mittigen Lochfehlstellen mehr auf und sind ebenfalls in Abbildung 4.25 (A) gezeigt. Die Stelle war aber noch als abgegrenzt zu erkennen und stellte auch in HPLC-Experimenten durch den dort auftreffenden Fluss noch eine mögliche „Sollbruchstelle“



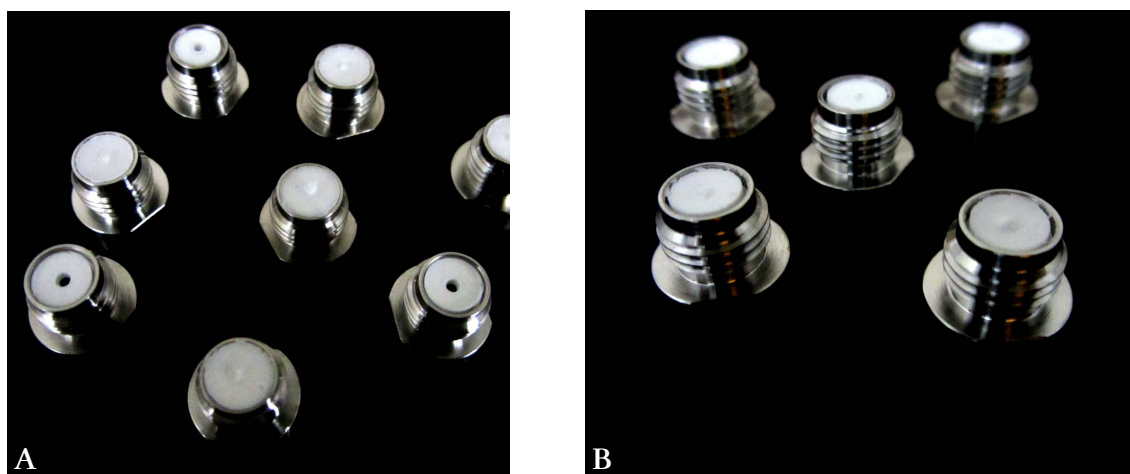


**Abbildung 4.24.** Apparativer Aufbau für die Herstellung von Monolithdisks in einem Inline-Solvent-Filter. Die Filter wurden (A) mit einem Blindstopfen oder (B) mit einer Kapillare und einer Kappe verschlossen.

dar. Die Monolithdisks wiesen ein deutliches Schrumpf- und Quellverhalten auf. Im trockenen Zustand schrumpften sie schnell, wie in Abbildung 4.25 (B) zu erkennen ist, quollen aber nach Benetzung wieder und füllten das Volumen aus.

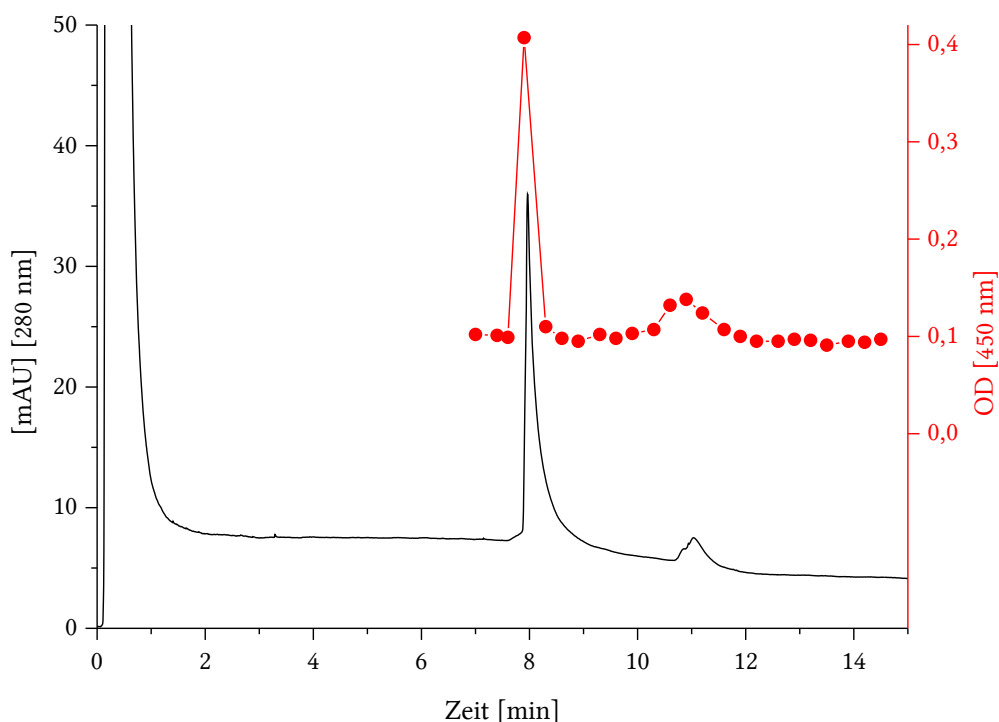
#### 4.3.4 Affinitätsexperimente

Die Funktionalisierung von Monolithsäulen und -disks, deren Herstellung in Abschnitt 4.3.3 auf Seite 112 beschrieben wurde, erfolgte mit einem rekombinanten Protein A (Genbank-Nummer YP\_498670), um in einem Affinitätsexperiment IgG aus Kaninchen-serum, zu dem es eine hohe Affinität aufweist<sup>[329]</sup>, zu isolieren. Protein A wird in ursprünglicher Form aus dem Bakterium *Staphylococcus aureus* gewonnen<sup>[10]</sup> und bindet IgG nicht über die F<sub>ab</sub>- (Antigen-binding Fragment) sondern über die F<sub>c</sub>-Region (crystallizable Fragment) und schützt sich somit vor einer Immunabwehr<sup>[359]</sup>. Das System Protein A/IgG ist ein in der Affinitätschromatographie im großen Maßstab eingesetztes Bindungspaar<sup>[358]</sup> und eignete sich deshalb zum Vergleich der in dieser Arbeit hergestellten Monolithe mit kommerziell erhältlichen Materialien. Protein A eignete sich auch wegen seiner Temperatur- und pH-Wert-Stabilität als ein relativ robustes Protein.



**Abbildung 4.25.** Monolithdisks ( $7 \times 2$  mm,  $77 \mu\text{L}$ ), die mit **GE 500** als Monomer und 1,25 Vol.-% Bortrifluoridetherat (1:10) als Katalysator in 75 Vol.-% Porogen (1,4-Dioxan/Methyl-*tert*-butylether (MTBE) (2:3)) in Inline-Solvent-Filtern hergestellt wurden. In (A) sind Monolithdisks mit mittigem Loch bzw. ohne Fehlstelle und in (B) geschrumpfte Monolithdisks abgebildet.

Die Edelstahlkapillaren mussten vor der *in-situ*-Polymerisation für die kovalente Anbindung des Monoliths silanisiert werden. Andernfalls wurden die Monolithkapillaren beim Anlegen eines Flusses aus der Kapillare gedrückt. In Abschnitt 2.4.2 auf Seite 38 sind gängige Funktionalisierungstechniken für Aminoliganden an epoxidbasierte Träger zusammengestellt. Die Monolithkapillaren ( $60 \times 0,5$  mm, OD  $\frac{1}{16}$ ",  $12 \mu\text{L}$ ) wurden anfänglich mit der unkompliziertesten Technik, der Epoxid-Methode, funktionalisiert, weil sie einfach durchzuführen war und der Monolith nicht weiter behandelt werden musste. Als Aminofunktionen dienten die Lysin-Seitenketten des Proteins. Die Säule wurde mit Carbonatpuffer (pH 9,6), in dem auch rekombinantes Protein A für den Immobilisierungsschritt gelöst wurde, konditioniert. Die Proteinkonzentration wurde mit  $10 \text{ mg mL}^{-1}$  höher, als in der Literatur<sup>[338]</sup> üblicherweise mit  $0,3\text{--}8 \text{ mg mL}^{-1}$  angegeben, gewählt. Durch die daraus resultierende höhere Proteindichte auf der Säule sollte die relativ langsame Reaktionskinetik<sup>[136,360]</sup> der Epoxid-Methode effektiviert werden. Die Funktionalisierung erfolgte statisch. Die Säule wurde mit der Proteinlösung befüllt und anschließend verschlossen. Sie konnte aus technischen Gründen nicht, wie in der Literatur<sup>[338]</sup> oft beschrieben, zirkuliert werden. Das Ziel der ersten Experimente war es, zu untersuchen, ob sich die Monolithkapillaren funktionalisieren ließen und in welcher Größenordnung ihre Kapazität lag. Deshalb wurde die Funktionalisierung<sup>[358]</sup> bereits nach 18 h bei  $30^\circ\text{C}$  anstelle mehrerer Tage Immobilisierungszeit beendet und mit Tris<sup>[117,338]</sup> geblockt. Nach Literaturangabe<sup>[338]</sup> erfolgt die Kopplung vor allem innerhalb der ersten 24 h, wobei eine höhere Temperatur die Kinetik begünstigt. Die Injektion des Kaninchenserums (1:10 in



**Abbildung 4.26.** Chromatogramm von eluiertem Immunglobulin G (IgG) aus Kaninchenserum (1:10 in PBS, pH 7,6), Chromatographische Bedingungen: Monolithkapillarsäule ( $60 \times 0,5$  mm, OD  $1/16''$ ,  $12 \mu\text{L}$ ), hergestellt mit **GE 500** als Monomer und 1,25 Vol.-% Bortrifluoridetherat (1:10) als Katalysator in 75 Vol.-% Porogen (1,4-Dioxan/Methyl-*tert*-butylether(MTBE) (2:3)), Flussrate  $0,4 \text{ mL min}^{-1}$ , manuelle Injektion von  $100 \mu\text{L}$  Serum (1:10),  $\lambda = 280 \text{ nm}$ , Waschpuffer PBS (A, pH 7,6), Elutionslösung Glycin-HCl (B, pH 2,2), 7 min A, 3 min B, 5 min A (—). Optische Dichte der eluierten Fraktionen (—●—).

PBS, pH 7,6) auf die Säule erfolgte manuell mit einer Spritze. Sie wurde daraufhin mit Anschlussstücken an die HPLC-Anlage angeschlossen. An einen Waschschrift mit PBS (pH 7,6), in dem alle nicht gebundenen Substanzen von der Säule gewaschen wurden, schloss sich der Elutionsschrift mit einer Glycin-HCl-Lösung (pH 2,2) an. Durch den stark erniedrigten pH-Wert sollte die Bindung zwischen IgG und rekombinantem Protein A gebrochen werden. Bei einer Flussrate von  $0,4 \text{ mL min}^{-1}$  betrug der Gegendruck ca. 60 bar (6 MPa). Ein ausgewähltes Chromatogramm ist in Abbildung 4.26 dargestellt, in dem ein Signal ( $t_R = 7,96 \text{ min}$ ) während der Elutionsbedingungen (Glycin-HCl-Lösung, pH 2,2) und ein weiteres ( $t_R = 11,04 \text{ min}$ ) kurz nach dem Pufferwechsel detektiert wurden.

Für die qualitative Analyse, ob es sich bei den eluierten Substanzen um IgG handelte, wurden die Elutionsvolumina fraktioniert und massenspektrometrisch mittels MALDI-TOF-MS untersucht. Zum Vergleich wurde kommerziell erworbenes aufgereinigtes IgG gemessen und eine Molekülmasse von ca. 144 kDa detektiert. Für den Nachweis von IgG

in den Fraktionen reichte aber die Sensitivität nicht aus. Die Analyse erfolgte daraufhin mit einem Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA). Dabei wurde das eluierte IgG in einer Mikrotiterplatte (high binding) fraktioniert und in einem Inkubationsschritt an die Kavitäten gebunden. Anschließend wurden frei gebliebene Stellen mit Casein geblockt, damit das zugegebene Anti-Kaninchen-IgG-Peroxidase-Konjugat selektiv nur an das immobilisierte IgG und nicht zusätzlich an die Kavität gebunden wurde. Überschüssiges Konjugat wurde durch einen Waschschrift entfernt. Die Zugabe der TMB-Lösung induzierte durch Reaktion mit der Peroxidase ein Farbsignal, das photometrisch ausgelesen wurde. Hätte es sich bei der eluierten Substanz nicht um IgG gehandelt, hätte kein Konjugat binden können und eine Farbreaktion wäre ausgeblieben. In den Eluatfraktionen beider Signale konnte IgG nachgewiesen werden, wie die Messdaten in Überlagerung mit dem Chromatogramm in Abbildung 4.26 zeigen. Ob neben IgG weitere unspezifisch gebundene Substanzen wie z.B. Albumine im Eluat vorlagen, konnte mit dem ELISA aber nicht überprüft werden. Die Elution des gebundenen IgGs erfolgte trotz des niedrigen pH-Werts von 2,2 demnach nicht vollständig in einem Schritt. Möglich ist, dass durch Änderung der Salzkonzentration beim Pufferwechsel eventuell auch unspezifisch gebunden gebliebenes IgG nochmals eluierte. Der gleiche Effekt ist in einem Chromatogramm von eluiertem IgG mit einer CIM<sup>®</sup> Protein A Disk von BIA Separations d.o.o. (Ajdovščina, Slovenien) zu sehen<sup>[361]</sup>. In diesem Experiment wurden unterschiedliche IgG-Konzentrationen ( $2,62\text{--}0,13\text{ mg mL}^{-1}$ ) injiziert. Das zweite Signal nach dem Pufferwechsel von Essigsäure, (0,5 M, pH 2,5) auf Tris-HCl (20 mM, pH 7,4) zeigte bei allen Messungen die gleiche Form und Intensität. Das Chromatogramm wird in der Quelle aber nicht weiter kommentiert.

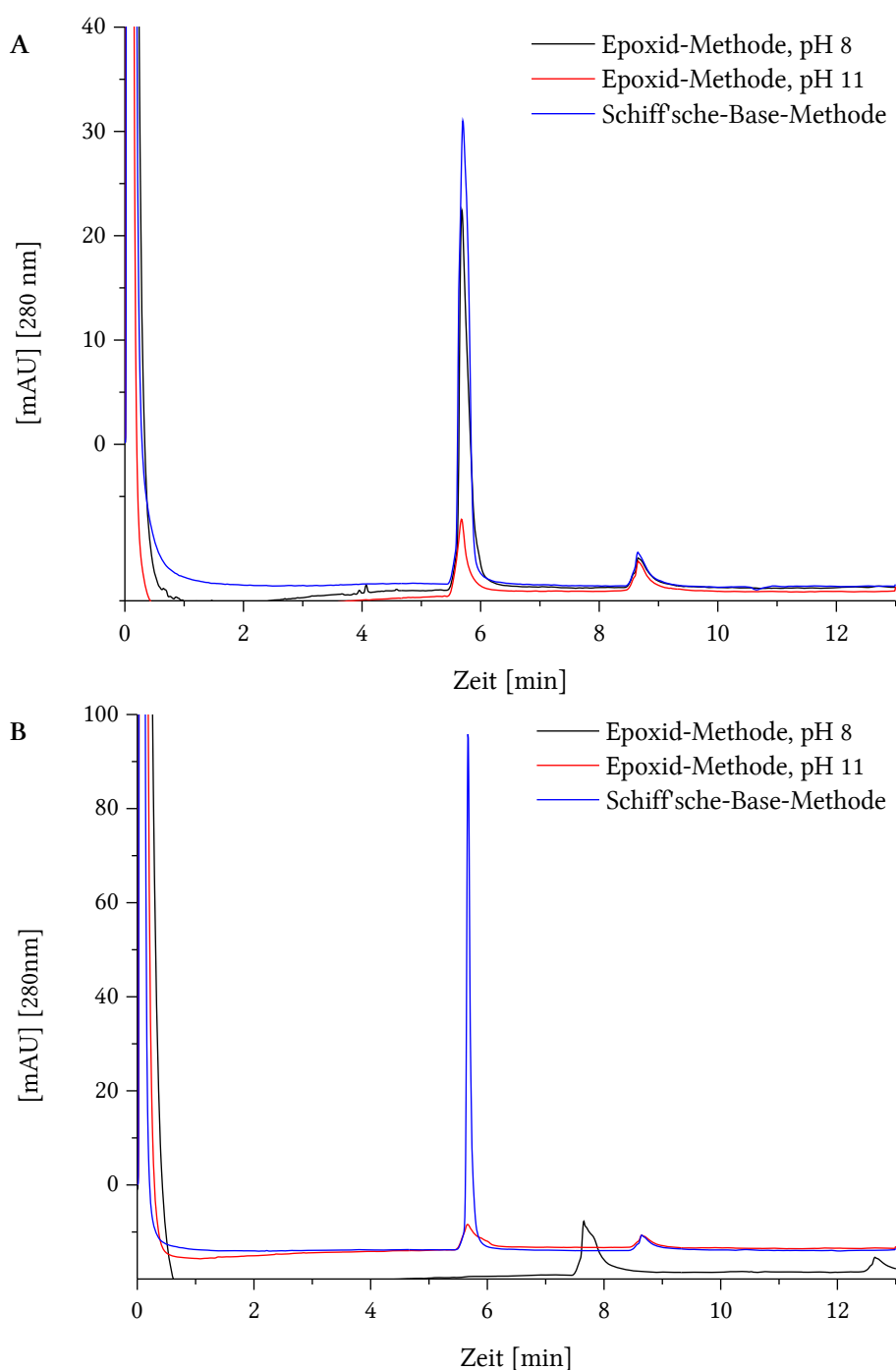
Zur Bestimmung der Kapazität wurde eine Kalibriergerade (vgl. Abbildung 3.2 (A) auf Seite 79) mit aus Kaninchenserum aufgereinigtem IgG aufgenommen. Sie betrug demnach  $0,44\text{ mg mL}^{-1}$  bzw.  $1\text{ mg g}^{-1}$ , bezogen auf das Säulenvolumen und war vergleichsweise gering. Mit dem GMA/EDMA-Monolith beispielsweise, den Luo et al. hergestellt hatten und dessen hohe spezifische Oberfläche schon zum Vergleich herangezogen wurde (vgl. Abschnitt A auf Seite 107), konnten  $20\text{ mg IgG g}^{-1}$  und mit Protein A-Sepharose<sup>®</sup> (P3391, Sigma) können ca.  $20\text{ mg mL}^{-1}$  isoliert werden. Als Ursachen für die geringe Kapazität wurde zum einen eine zu geringe spezifische Oberfläche ( $7\text{ m}^2\text{ g}^{-1}$ ) aufgrund zu großer Poren ( $12\text{ }\mu\text{m}$ ) und zum anderen eventuell zu wenig vorhandene funktionalisierbare Epoxidgruppen angenommen. Andere Funktionalisierungstechniken und eine Zirkulation der Proteinlösung, durch die das Protein neben Diffusion unterstützend durch Konvektion zur Oberfläche des Monoliths gelangt wäre, wären vielleicht effizienter gewesen, hätten aber vermutlich nicht zu einer um Größenordnungen höheren Kapazität geführt. JIANG et al.<sup>[338]</sup> bestimmten in Experimenten, dass sich die Kapazität durch Zir-

kulation der Immobilisierungslösung bzw. durch andere Kopplungstechniken wie die SCHIFFSche-Base- oder CDI-Methode etwa verdoppelte.

Im Folgenden wurden analog affinitätschromatographische Experimente mit Kaninchenserum (1:5 in PBS, pH 7,6) und Monolithen im Diskformat ( $7 \times 2$  mm, 77  $\mu$ L) durchgeführt, die mit 70 und 75 Vol.-% Porogen hergestellt wurden. Das Diskformat wurde gewählt, weil der Monolith somit auf Blasen und eine eventuelle Spaltenbildung durch Schrumpfung in der Kartusche untersucht werden konnte. Die beiden Materialien sollten hinsichtlich eines Kapazitätsunterschieds verglichen werden. Außerdem wurden sie jeweils sowohl mit der Epoxid-Methode bei den pH-Werten 8 und 11 als auch durch eine SCHIFFSche-Base-Reaktion funktionalisiert. Bei der Epoxid-Methode sollte überprüft werden, ob ein höherer pH-Wert die Kopplung begünstigt. Für die Kopplung ist es wichtig, dass die zu koppelnde Aminofunktion nicht in ihrer protonierten und dadurch inaktiven Form für einen nukleophilen Angriff der Epoxidgruppe vorliegt. Mit pH 11 wurde deshalb ein pH-Wert gewählt, der oberhalb des  $pK_S$ -Werts ( $\epsilon$ -( $\text{NH}_3^+$ )) 10,28<sup>[362]</sup> von Lysin liegt. Außerdem betrug die Immobilisierungszeit diesmal anders als bei der Funktionalisierung der Monolithkapillarsäule nicht nur 18 Stunden, sondern 8 Tage. Eine längere Reaktionszeit kann aber auch die Denaturierung des Proteins bzw. störende Wechselwirkungen zwischen den Proteinen zur Folge haben<sup>[338]</sup>. Die Immobilisierung mittels SCHIFFScher-Base-Methode orientierte sich an der Literaturangabe<sup>[117]</sup>.

Der Gegendruck beider Materialien betrug bei einer im Vergleich zu den Experimenten mit den Monolithkapillarsäulen 5-fach so hohen Flussrate von 2 mL min<sup>-1</sup> ca. 51 bar (5,1 MPa) und entsprach damit dem Systemdruck. Die Monolithe wiesen damit einen zu vernachlässigenden hydraulischen Widerstand auf. Trotz einer hohen Porosität von ca. 66 % der Materialien wurde ein vom Monolith verursachter Gegendruck erwartet. Deshalb konnte nicht ausgeschlossen werden, dass kleine Risse im Material beispielsweise in der Mitte der Disk oder mit bloßem Auge nicht zu erkennende Spalten zwischen Monolith und Filterwand, die durch die Präparationstechnik bzw. Schrumpfung entstanden sein könnten (vgl. Abschnitt 4.3.3 auf Seite 112), vorlagen, durch die der Eluent ungehindert floss.

Die Chromatogramme der Experimente sind in Abbildung 4.27 gezeigt. Zur Bestimmung der Kapazitäten, die in Tabelle 4.4 zusammengestellt sind, wurde erneut eine Kalibriergerade mit aus Kaninchenserum aufgereinigtem IgG aufgenommen (vgl. Abbildung 3.2 (B) auf Seite 79). Die Kapazitäten der beiden Monolithmaterialien unterschieden sich bei keiner Funktionalisierungsart merklich untereinander. Und auch die Kapazitäten beider Materialien, die mit der Epoxid-Methode bei pH 8 bzw. der SCHIFFSchen-Base-Methode hergestellt wurden, waren vergleichbar. Die Monolithdisks, die mit der Epoxid-Methode bei pH 8 hergestellt wurden, wiesen jedoch eine ca. 3-fach höhere Kapazität als die Mo-



**Abbildung 4.27.** Chromatogramm von eluiertem Immunglobulin G (IgG) aus Kanimchenserum (1:5 in PBS, pH 7,6), Chromatographische Bedingungen: Monolithdisks ( $7 \times 2$  mm,  $77 \mu\text{L}$ ), die mit **GE 500** als Monomer und 1,25 Vol.-% Bortrifluoridetherat (1:10) als Katalysator in (A) 70 Vol.-% und (B) 75 Vol.-% Porogen (1,4-Dioxan/Methyl-*tert*-butylether (MTBE) (2:3)) hergestellt und jeweils mittels der Epoxid-Methode (pH 8 und 11) bzw. SCHIFF'scher-Base-Methode funktionalisiert wurden, Flussrate  $2 \text{ mL min}^{-1}$ , manuelle Injektion von  $1000 \mu\text{L}$  Serum (1:5),  $\lambda = 280 \text{ nm}$ , Waschpuffer PBS (A, pH 7,6), Elutionslösung Glycin-HCl (B, pH 2,2), 5 min A, 3 min B, 5 min A bzw. für (B, —) 7 min A, 5 min B, 5 min A.

**Tabelle 4.4.** Kapazitäten von Monolithdisks ( $7 \times 2$  mm,  $77 \mu\text{L}$ ), die mit **GE 500** als Monomer und 1,25 Vol.-% Bortrifluoridetherat (1:10) als Katalysator in 75 bzw. 70 Vol.-% Porogen (1,4-Dioxan/Methyl-*tert*-butylether (MTBE) (2:3)) hergestellt und mittels der Epoxid-Methode (pH 8 und 11) bzw. mittels SCHIFFScher-Base-Methode funktionalisiert wurden.

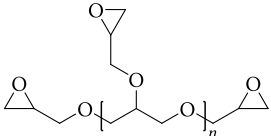
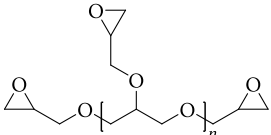
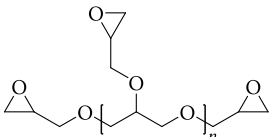
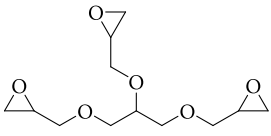
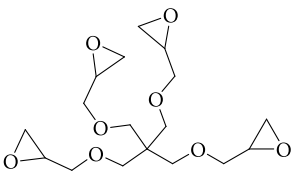
Monolithdisk	Epoxid-Methode		SCHIFFSche-Base-Methode
	pH 8	pH 11	
70 Vol.-%	$0,17 \text{ mg mL}^{-1}$	$0,05 \text{ mg mL}^{-1}$	$0,19 \text{ mg mL}^{-1}$
75 Vol.-%	$0,17 \text{ mg mL}^{-1}$	$0,06 \text{ mg mL}^{-1}$	$0,21 \text{ mg mL}^{-1}$

monolithdisks die bei pH 11 funktionalisiert wurden, auf. Erwartet wurde der gegenteilige Effekt. Vermutlich werden die Epoxidgruppen jedoch bevorzugt eher durch Hydroxidionen als durch die Aminofunktionen des Proteins nukleophil angegriffen und/oder das Protein wurde denaturiert. Ein höherer pH-Wert, um die Deprotonierung der zu kopelnden Aminofunktion sicherzustellen, kann ausgrunddessen nicht verwendet werden. Alle ermittelten Kapazitäten waren aber, auch trotz doppelt konzentriertem eingesetztem Kaninchenserum, um ein Vielfaches geringer als die der Kapillarsäule ( $0,44 \text{ mg mL}^{-1}$ ). Da es sich um das gleiche monolithische Material und die gleichen chromatographischen Bedingungen handelte, war es denkbar, dass durch die manuelle Injektion des Serums nicht das gesamte Diskvolumen benetzt wurde und ungenutzt blieb. In allen Chromatogrammen ist, wie auch schon im Chromatogramm der Monolithkapillare, ein zweites Signal nach dem Pufferwechsel zu erkennen, das, wie in den bereits erwähnten Chromatogrammen von BIA Separations d.o.o. (Ajdoščina, Slovenien), bei allen Messungen die gleiche Form und Intensität aufwies. Die geringen Kapazitäten machten letztlich eine Optimierung des Materials in weiteren Arbeiten notwendig.

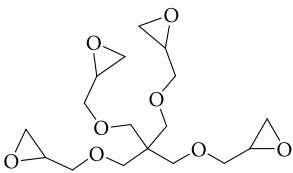
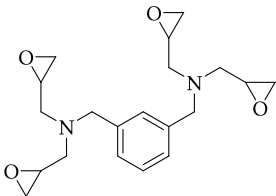
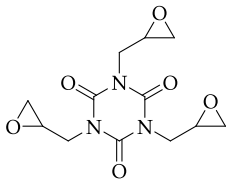
## 4.4 Monolithsynthese mit Monomergemischen

Ein hoher Epoxidgehalt ist für ein rigides Material mit einer zugleich hohen Kapazität vonnöten, da die Epoxidgruppen sowohl für die Autopolymerisation und Quervernetzung als auch für die anschließende Funktionalisierung gebraucht werden. Als Ursache der geringen Kapazität der Monolithkapillarsäulen bzw. -disks, hergestellt mit GE 500 als Monomer (vgl. Abschnitt 4.3.4 auf Seite 115), wurde deshalb neben einer zu geringen spezifischen Oberfläche von  $7 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$  ein zu geringer Epoxidgehalt des Monomers vermutet. Aufgrund dessen wurde der Epoxidgehalt von GE 500 durch Titration überprüft und zusätzlich nach weiteren polyfunktionellen Epoxidmonomeren mit einem höheren Epoxidgehalt recherchiert. Die getroffene Auswahl ist in Tabelle 4.5 zusammengestellt.

**Tabelle 4.5.** Epoxidäquivalentgewichte (EEW in [g äq.<sup>-1</sup>]) alternativer polyfunktioneller Glycidylether. Es sind die Angaben der Anbieter und in Klammern die theoretischen Werte angegeben. Niedrige EEW entsprechen hohen Epoxidgehalten.

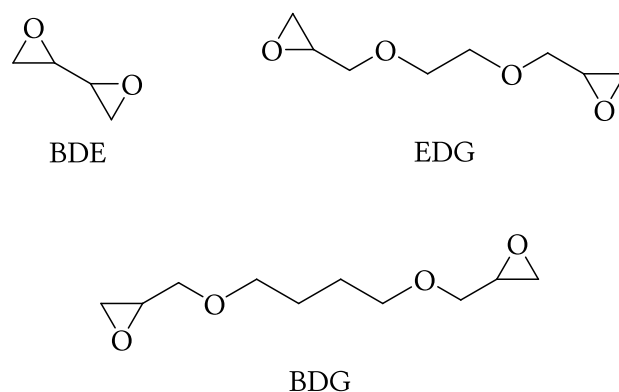
Struktur	CAS	Anbieter	EEW
<b>Denacol EX-512</b>			
	118549-88-5	Nagase <sup>a</sup>	169 (111)
<b>Denacol EX-521</b>			
	118549-88-5	Nagase <sup>a</sup>	180 (111)
<b>Polyglycerol-3-polyglycidylether, ERISYS™ GE-38</b>			
	118549-88-5	Emerald <sup>b</sup>	160-180 (111)
<b>Denacol EX-313</b>			
	25038-04-4	Nagase <sup>a</sup>	141 (87)
<b>Pentaerythritolpolyglycidylether, ERISYS™ GE-40</b>			
	30973-88-7	Emerald <sup>b</sup>	156-170 (90)



Struktur	CAS	Anbieter	EEW
<b>Pentaerythritolglycidylether</b>			
	3126-63-4	Frontier Scientific <sup>c</sup>	102 (90)
<b>Tetraglycidyl-<i>meta</i>-xyldiamin, ERISYS™ GA-240</b>			
	63738-22-7	Emerald <sup>b</sup>	95-110 (90)
<b>Tris(2,3-epoxypropyl)isocyanurat</b>			
	2451-62-9	Polysciences <sup>d</sup>	105 (99)

<sup>a</sup> Nagase (Europa) GmbH (Düsseldorf)<sup>b</sup> Emerald Performance Materials, LLC (Moorestown, USA)<sup>c</sup> Frontier Scientific, Inc. (Logan, USA)<sup>d</sup> Polysciences Europe GmbH (Eppenheim)

GE 500 entsprechend wurden mit Denacol EX-512 und Denacol EX-521 von Nagase (Europa) GmbH (Düsseldorf) bzw. mit ERISYS™ GE-38 von Emerald Performance Materials, LLC (Moorestown, USA) drei weitere Angebote gefunden, die mit 160-180 g äq.<sup>-1</sup> zu dem von Raschig GmbH (Ludwigshafen) angebotenen GE 500 mit 189 g äq.<sup>-1</sup> kein entscheidend niedrigeres Epoxidäquivalentgewicht besaßen. Ein theoretischer Wert konnte nicht berechnet werden, weil es sich um Mischungen, bestehend aus unterschiedlich stark verzweigten Ethern, handelte, die zudem aus unterschiedlich vielen Glyceroleinheiten aufgebaut waren. Als Orientierungswert für *n* wurde, wie eingangs erwähnt, fünf angenommen. Denacol EX-313, ein weiterer Ether von Nagase, entsprach dem auch in dieser Arbeit für Monolithsynthesen eingesetzten GE 100 von Raschig (vgl. Abschnitt 4.3.1 auf Seite 101) und wies mit 141 g äq.<sup>-1</sup> ein vergleichendes Äquivalentgewicht zu 145 g äq.<sup>-1</sup> von GE 100 auf.



**Abbildung 4.28.** Strukturen der als Comonomere eingesetzten Diepoxide 1,3-Butadiendiepoxid (BDE), Ethylenglycoldiglycidylether (EDG) und 1,4-Butandiol diglycidylether (BDG).

Im Vergleich mit dem theoretisch berechneten Wert von  $87 \text{ g äq.}^{-1}$  bedeutete dies, dass beide Monomere durchschnittlich kaum mehr als zwei (61 %) der angenommenen drei Epoxidgruppen enthielten. Analog verhielt es sich mit dem Epoxidgehalt von ERISYS™ GE-40, einem Pentaerythritolpolyglycidylether von Emerald Performance Materials, dessen Epoxidäquivalentgewicht mit  $156\text{--}170 \text{ g äq.}^{-1}$  schwankte und der selbst mit  $156 \text{ g äq.}^{-1}$  nur zwei (58 %) der möglichen vier Epoxidgruppen aufwies. Der gleiche Ether von Frontier Scientific, Inc. (Logan, USA) wies laut Angabe von  $102 \text{ g äq.}^{-1}$  ein dem theoretischen Äquivalentgewicht von  $99 \text{ g äq.}^{-1}$  nahezu entsprechenden Epoxidgehalt auf. Das auf Anfrage zur Verfügung gestellte NMR-Spektrum, nach dem die Reinheit mit 95 % bestimmt und von der auf das Epoxidäquivalentgewicht geschlossen wurde, zeigte aber neben den zu erwartenden noch weitere Signale und war dem Spektrum des in dieser Arbeit synthetisierten Pentaerythritoltetraglycidylethers (**1**) ähnlich (vgl. Abschnitt 4.1.1 auf Seite 81). Daneben wies auch Tetraglycidyl-*meta*-xyloldiamin (ERISYS™ GA-240) mit  $95\text{--}110 \text{ g äq.}^{-1}$  im Vergleich zum theoretischen Äquivalentgewicht von  $90 \text{ g äq.}^{-1}$  einen vielversprechenden Epoxidgehalt auf. Das Polymer wäre jedoch durch das aromatische System hydrophob und würde dadurch hydrophobe unspezifische Bindungen begünstigen. Tris(2,3-epoxypropyl)isocyanurat (TEPIC) von Polysciences Europe GmbH (Eppelheim) ist der Vollständigkeit wegen aufgeführt und liegt nach dem Epoxidäquivalentgewicht in 98 %iger Reinheit vor, die laut Anbieter mittels GC bestimmt wurde.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass kein alternatives tri- oder tetrafunktionelles Epoxidmonomer gefunden werden konnte, das über einen ausreichend hohen Epoxidgehalt verfügte und sich zugleich in seiner Polarität eignete.

Die Idee war deshalb, nicht nur ein polyfunktionelles Monomer wie bisher in einer Autopolymerisation zu vernetzen, sondern ein Epoxidgemisch bestehend aus GE 500 und

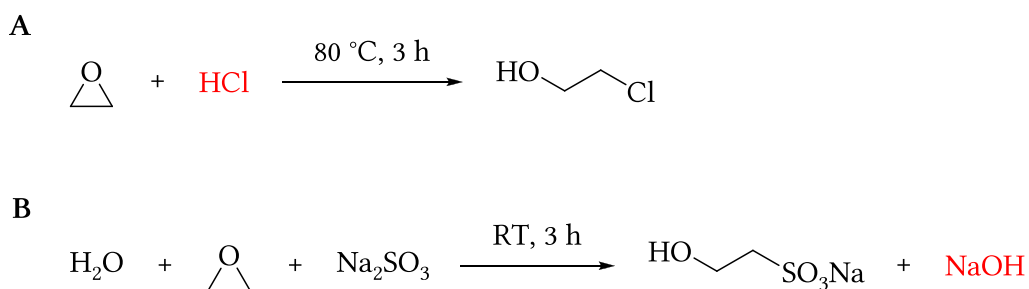
einem Diepoxid, das reiner erhältlich ist, einzusetzen. Porogenmischung und -anteil sollten unverändert bleiben. Durch den gleichbleibenden Porogenanteil von 75 Vol.-% sollte eine weiterhin hohe Porosität für eine gute Permeabilität beibehalten werden.

Die Strukturen der eingesetzten Diepoxide sind in Abbildung 4.28 gezeigt. Die Reinheit der verwendeten Chargen betrug für 1,3-Butadiendiepoxid (BDE) 99,1 %, ( $\geq 97$  %) und für 1,4-Butandiolglycidylether (BDG) 96,1 % ( $\geq 95$  %). Für Ethylenglycoldiglycidylether (EDG) lag keine Reinheitsangabe vor. Die Epoxidgehalte wurden, wie im Folgenden beschrieben, mittels Titration überprüft und die Reinheiten der Diepoxide zudem durch die Aufnahme von NMR-Spektren kontrolliert. In Monolithsynthesen wurde der Anteil des Diepoxids bei einem konstanten Gesamtmonomeranteil von 25 Vol.-% variiert. Die aussichtsreichsten Ansätze wurden im Hinblick auf ihre Härte und porösen Eigenschaften untersucht. Mit dem geeignetsten Material wurde eine Monolithdisk hergestellt und wieder mit rekombinantem Protein A funktionalisiert.

#### 4.4.1 Bestimmung des Epoxidgehalts

Nach DIN<sup>[225–227]</sup> wird der Epoxidgehalt durch Titration von z. B. Tetraethylammoniumbromid mit Perchlorsäure und über den dabei *in situ* erzeugten Bromwasserstoff bestimmt. Aufgrund des Einsatzes von Perchlorsäure sind bestimmte Sicherheitsmaßnahmen einzuhalten, die nicht gewährleistet werden konnten.

Deshalb wurde der Epoxidgehalt, wie in Abbildung 4.29 (A) dargestellt, durch Hydrochlorierung mit Salzsäure und Rücktitration des Überschusses mit Natronlauge bestimmt.



**Abbildung 4.29.** Reaktionen zur Bestimmung des Epoxidgehalts durch Titration der rot markierten Spezies. (A) Hydrochlorierung mit Salzsäure, (B) Ringöffnung mit Natriumsulfit.

Sie kann im Wässrigen sowie in Alkoholen, Pyridin, Diethylether, Pyridin-Chloroform, Ethylglycol oder 1,4-Dioxan durchgeführt werden. SIGGIA und HANNA<sup>[228]</sup> empfehlen für Epoxidharze die Bestimmung durch Hydrochlorierung in 1,4-Dioxan durchzuführen, weil sich die Harze vollständig lösen, sie einfach durchzuführen ist und nur  $\alpha, \beta$ -ungesättigte Carbonylverbindungen einen störenden Einfluss ausüben, die allerdings

**Tabelle 4.6.** Durch Titration bestimmte Epoxidäquivalentgewichte (EEW in [g äq.<sup>-1</sup>]) bzw. Epoxidwerte (EN in [äq.<sup>-1</sup>/100 g]) von **GE 500** und den als Comonomere eingesetzten Diepoxiden 1,4-Butandiol diglycidylether (**BDG**), Ethylenglycoldiglycidylether (**EDG**) und 1,3-Butadien diepoxid (**BDE**) sowie zum Vergleich die Angabe der Anbieter und die theoretischen Werte.

Hydrochlorierung		Natriumsulfit		Anbieterangabe		Theoretisch	
EN	EEW	EN	EEW	EN <sup>a</sup>	EEW	EN	EEW
<b>GE 500<sup>c</sup></b>							
0,31	323	0,35	287	0,53	189	0,90 <sup>b</sup>	111 <sup>b</sup>
<b>BDG<sup>c</sup></b>							
0,36	282	0,96	104	k. A.		0,92	109
<b>EDG<sup>c</sup></b>							
0,43	232	0,74	135	k. A.		1,15	87
<b>BDE<sup>c</sup></b>							
1,25	80	2,27	44	k. A.		2,32	43

<sup>a</sup> Die Werte wurden aus den vom Anbieter angegebenen Epoxidäquivalentgewichten nach Gleichung 2.3 auf Seite 23 berechnet.

<sup>b</sup> Wert gilt für  $n = 5$ .

<sup>c</sup> Lot(GE 500) 05100390/001, Lot(BDG) MKBL8443V, Lot(EDG) 1159189, Lot(BDE) 1436110V.

auch bei anderen Titrationsmethoden Interferenzen zeigen. Auch die Hydrolyse durch Anwesenheit von Wasser sei zu vernachlässigen.

Die Titration wurde nach einer Vorschrift von BECHTLE<sup>[349]</sup> durchgeführt, nach der der Epoxidgehalt in Monolithen bestimmt wurde. Titriert wurden GE 500 und die drei Diepoxidmonomere BDG, EDG und BDE. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.6 zusammengefasst. Obwohl sich alle Monomere in der 1,4-Dioxan/Salzsäure-Lösung lösten, lagen alle bestimmten Gehalte deutlich unter den berechneten Werten bzw. unter den Angaben der Anbieter. BDE enthielt ca. 55 % und alle anderen Monomere nur ca. 40 % der theoretisch möglichen Epoxidgruppen.

Die Titration wurde daraufhin, wie in Abbildung 4.29 (**B**) gezeigt, durch Ringöffnung mit Natriumsulfit und Titration der dabei entstehenden Natronlaugeäquivalente wiederholt. Für GE 500 wurde kein höherer Epoxidgehalt bestimmt, demzufolge waren möglicherweise tatsächlich weniger Epoxidgruppen in GE 500 gebunden als angenommen. Eine Unterbestimmung kann aber auch durch zusätzliche Base konsumierende Gruppen verursacht worden sein. Wie in Abschnitt 2.2.3 auf Seite 19 ausgeführt, werden polyfunktionelle Glycidylether durch Bildung eines Halohydrins und anschließender Dehydro-

halogenierung im Basischen synthetisiert. Es ist denkbar, dass diese bei der Herstellung von GE 500 nicht vollständig verlaufen war und verbliebene Halohydrine die gebildeten Basenäquivalente verbrauchten. Der zusätzliche Verbrauch von Base hätte auch bei der Hydrochlorierung und Rücktitration mit Natronlauge zur Unterbestimmung geführt.

Die Titration von BDE ergab hingegen einen Epoxidgehalt von nahezu 100 %. Für BDG ergab sich eine leichte Überbestimmung und für EDG wurde ein Epoxidgehalt von 64 % bestimmt. Dies wurde auch durch die aufgenommenen NMR-Spektren (vgl. Abbildungen A.9-A.13 auf Seite 159) bestätigt. Das Spektrum von BDE zeigte neben den zu erwartenden Signalen nur ein zusätzliches Signal von Wasser, das wahrscheinlich aus DMSO, mit dem die Proben für die Messung gemischt wurden, stammte. Gleiches galt für das Spektrum von BDG. In beiden Spektren stimmte die Integration der Signale mit der Anzahl der in der Struktur gebundenen Protonen überein. Das Spektrum von EDG zeigte hingegen noch vorliegende Verunreinigungen. Das bedeutete, dass BDE pro Gramm über einen 2,4-fach so hohen Epoxidgehalt wie BDG bzw. einen 3-fach so hohen wie EDG verfügte. Im Vergleich zu GE 500 war der Gehalt von BDG um das 2,7-fache, der von EDG um das 2,1-fache und der von BDE sogar um das 6,5-fache höher.

#### 4.4.2 Variation des Diepoxidanteils und Härtebestimmung

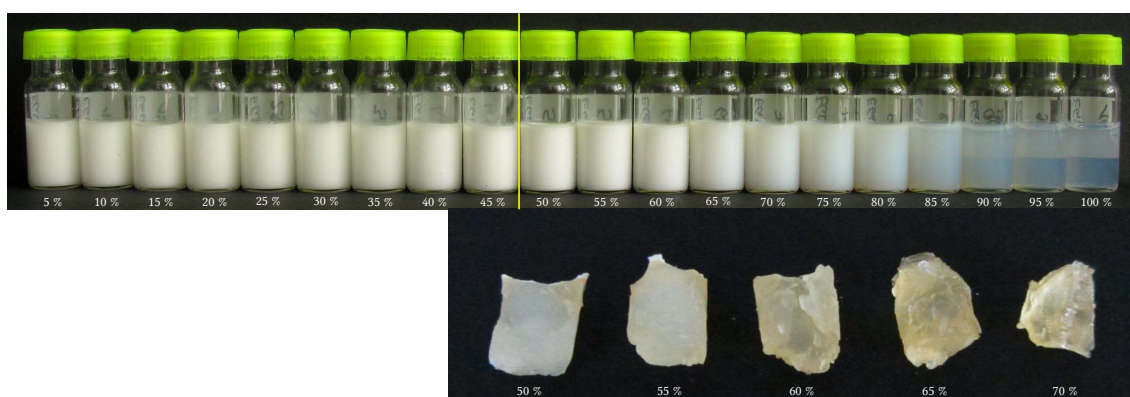
Die Reaktionsbedingungen sollten, wie eingangs bereits erwähnt, konstant gehalten und nur die Monomermischung mit einem Gesamtanteil von 25 Vol.-% optimiert werden. Dafür wurde der Anteil der drei Diepoxide von 5 bis 100 % in fünf Prozent-Schritten erhöht. Im Vergleich zum Ansatz mit ausschließlich 25 Vol.-% GE 500 wurde der Epoxidgehalt, auf Grundlage der Titrationsergebnisse (vgl. Abschnitt 4.4.1 auf Seite 125), durch Beimischung von BDG und EDG stetig bis zum 100 %igen Anteil etwa verdoppelt und durch Beimischung von BDE bis zum 100 %igen Anteil sogar versechsfacht. Fotos der drei Versuchsreihen sind in Abbildung 4.30 gezeigt.

Es ist zu erkennen, dass eine Phasenseparation bei Zugabe von BDG bis zu einem Anteil von 50 % auftrat und die Monolithblöcke mit höheren Anteilen immer transparenter wurden. Der Ansatz, der 100 % BDG enthielt, polymerisierte erst bei Zugabe der doppelten Katalysatormenge zu einem transparenten Monolithblock. Die Mischungen mit EDG polymerisierten ausnahmslos mit einfacher Katalysatormenge, wobei eine Phasenseparation nur bis zu einem Anteil von ca. 75 % eintrat. Mit BDE als Comonomer trat eine Phasenseparation ebenfalls bis zu einem Anteil von 75 % ein, ab 90 % blieben die Ansätze aber flüssig. Die Zugabe der doppelten Katalysatormenge zum Ansatz mit 100 % BDE führte auch hier zu einem phasenseparierten Monolithblock. Durch den steigenden Anteil der Diepoxide und gleichzeitiger Abnahme des Anteils von GE 500 wurde

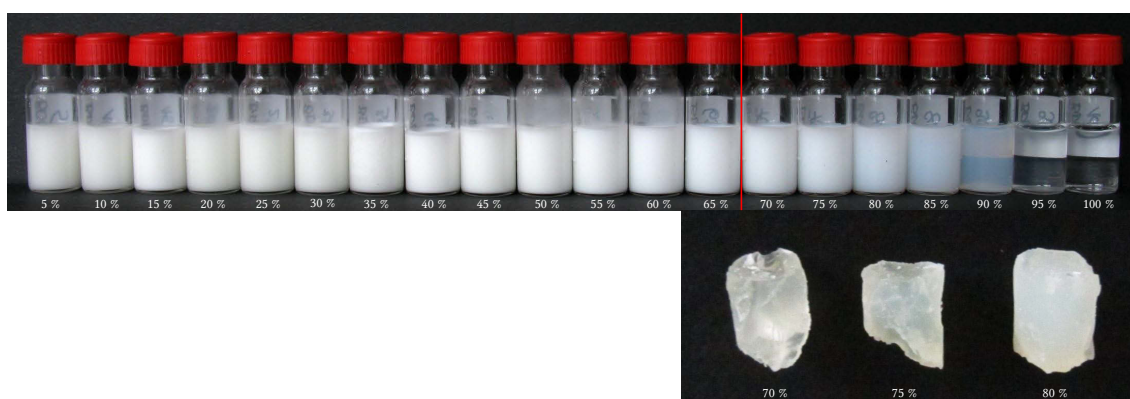
### BDG



### EDG



### BDE



**Abbildung 4.30.** Versuchsreihen von Monolithblöcken, die mit einem Monomergemisch, bestehend aus **GE 500** und 1,4-Butandiolglycidylether (**BDG**), Ethylenglycoldiglycidylether (**EDG**) oder 1,3-Butadiendiepoxid (**BDE**) als Comonomer und 1,25 Vol.-% Bortrifluoridetherat (1:10) als Katalysator in 75 Vol.-% Porogen (1,4-Dioxan/Methyl-*tert*-butylether (MTBE) (2:3)) hergestellt wurden. Außerdem Aufnahmen der nach der Trocknung transparent gewordenen Monolithe und eingezeichneter Grenze in den Versuchsreihen, ab der der Effekt eintrat. Der Anteil des Diepoxids wurde anteilig an 25 Vol.-% Gesamtmonomeranteil in fünf Prozent-Schritten von 5 bis 100 % erhöht.

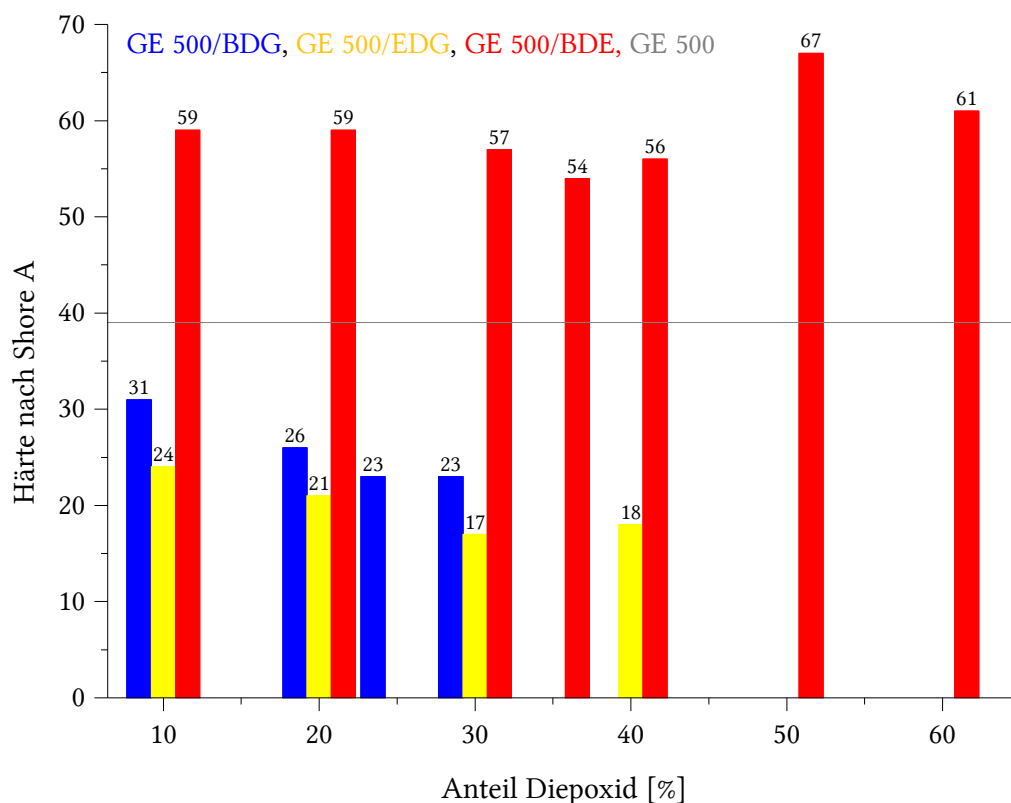
die Monomermischung und schließlich das gebildete Polymer wahrscheinlich für die Porogenmischung unter anderem zu hydrophil, sodass die Phasenseparation, wie beobachtet, immer später eintrat, was eine Reduzierung der Porengröße zur Folge hatte. Die Blöcke erschienen dadurch transparent. Das Ausbleiben der Bildung eines festen Monolithblocks bei einigen Ansätzen muss kein Indiz für das Ausbleiben der Polymerisation gewesen sein. Die gebildeten Polymerketten waren vermutlich zu hydrophil, um zu präzipitieren. Die doppelte Katalysatormenge führte zu einer stärkeren Vernetzung, durch die die Bildung des transparenten Feststoffs mit folglich sehr kleinen Poren induziert wurde (vgl. Abschnitt 2.1.3 auf Seite 9).

Nach Trocknung der Monolithe waren die zuvor noch phasenseparierten Blöcke von BDG (40-50 %), EDG (50-75 %) und BDE (65-75 %) stark geschrumpft und transparent. Die Schrumpfung von Polymeren, besonders durch erhöhte Temperatur, ist bekannt und wird durch die Knäuelung der Makromoleküle erklärt<sup>[363]</sup>. Damit lässt sich auch die Beobachtung plausibel erklären, dass die Schrumpfung umso stärker eintrat je länger die Alkylkette zwischen den beiden Epoxidgruppen war. Die längeren Ketten konnten sich leichter und stärker knäueln. Ab einem bestimmten Anteil an Comonomer führte dies zum Zusammenfallen des gesamten Monolithblocks. Dadurch reduzierte sich die Porengröße, das Material wurde dichter und erschien transparent.

Die Härte nach SHORE A wurde nur von den folgenden phasensepariert gebliebenen Ansätzen bestimmt:

- BDG: 10 %, 20 %, 25 %, 30 %,
- EDG: 10 %, 20 %, 30 %, 40 %,
- BDE: 10 %, 20 %, 30 %, 35 %, 40 %, 50 %, 60 %.

Sie sind im Säulendiagramm in Abbildung 4.31 dargestellt. Die Werte schwankten dabei nicht so stark in Abhängigkeit der vermessenen Scheibe und der Messstelle auf einer Scheibe wie bei den GE-500-Monolithen. Die Schwankungen bei den Monolithen mit EDG und BDG als Comonomere betrugen maximal drei Einheiten. Bei den Monolithen mit BDE nahmen sie mit steigendem Anteil an BDE von 15 (10 % BDE) auf 5 (60 % BDE) ab. Die gemessenen Härten waren zudem nahezu unabhängig von dem Anteil an beigemengtem Comonomer. Die Monolithe, die mit EDG und BDG hergestellt wurden, waren mit gemittelten Härten von 20 und 26 nahezu gleich hart und weicher als der GE-500-Monolith, der eine Härte von 39 aufwies. Die Blöcke, die mit BDE polymerisiert wurden, waren mit einer gemittelten Härte von 59 hingegen im Durchschnitt um das 1,5-fache härter. Das ist plausibel durch den höheren Epoxidgehalt der Ansätze mit BDE zu erklären. Dadurch war eine stärkere Vernetzung möglich, die zu einer höheren Rigidität



**Abbildung 4.31.** Härten nach SHORE A ausgewählter Monolithblöcke, die mit einem Monomergemisch, bestehend aus **GE 500** und 1,4-Butandioldiglycidylether (**BDG**), Ethylenglycoldiglycidylether (**EDG**) oder 1,3-Butadiendiepoxid (**BDE**) als Comonomer mit variierendem Anteil und 1,25 Vol.-% Bortrifluoridetherat (1:10) als Katalysator in 75 Vol.-% Porogen (1,4-Dioxan/Methyl-*tert*-butylether (MTBE) (2:3)) hergestellt wurden. Der Monolith, hergestellt nur mit GE 500 als Monomer in 75 Vol.-% Porogen, wies im Vergleich eine Härte von 39 auf.

der Monolithe führte. Außerdem kann die nicht vorhandene Verbrückung der Epoxidgruppen in BDE einen Einfluss auf ein starrereres Netzwerk gehabt haben. BDG und EDG weisen hingegen längere Alkylketten zwischen den beiden Epoxidgruppen auf, durch die die Netzwerke umgekehrt folglich flexibler wurden. Sie wurden damit sogar trotz höherem Epoxidgehalt flexibler als der GE-500-Monolith. Die BDE-Monolithe waren im Vergleich sogar härter, als der härteste GE-500-Monolith, der mit 60 Vol.-% Porogenanteil hergestellt wurde und eine Härte von 51 aufwies.

#### 4.4.3 Morphologie und Porosimetrie

Die Morphologie aller Proben wurde mittels ESEM untersucht. Ausgewählte Aufnahmen sind in Abbildung 4.32 gezeigt. Die Monolithe mit BDG als Comonomer zeigten bis zu einem Anteil von 20 % eine globuläre makroporöse Struktur, die mit einem Anteil

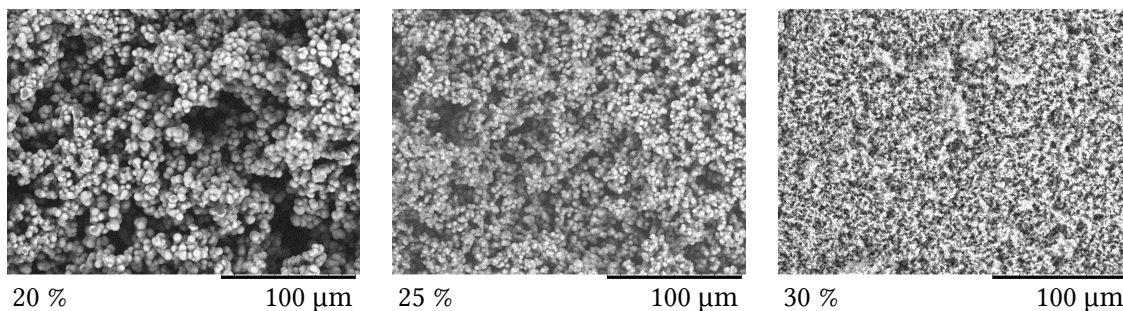


von 25 % feiner und mit 30 %igem Anteil dichter wurde und sich nicht mehr aus globulären Clustern zusammensetzte, die ein makroporöses Porennetzwerk bildeten, wie es auf den anderen beiden Aufnahmen zu erkennen war. Mit EDG als Komponente zeigte sich die gewohnt globuläre Struktur, die sich ab einem Anteil von 40 % verfeinerte und ab 45 % wieder dicht und nicht mehr globulär war. Bei den Monolithen mit BDE, trat die Strukturänderung mit 35 %igem Anteil ein. Die Struktur wurde mit steigendem BDE-Anteil von 40 über 50 zu 60 % immer dichter und auf der Aufnahme des Monoliths mit 60 %igem Anteil BDE sind mit der Auflösung des ESEM keine Poren mehr zu erkennen. Die Porosimetriemessungen erfolgten mittels Quecksilber-Intrusionsporosimetrie. Die Daten sind in Tabelle 4.7 zusammengestellt und die Porengrößenverteilungen graphisch in den Abbildungen 4.33 bis 4.35 dargestellt (vgl. Quecksilber-Intrusionskurven in Abbildung A.8 (**B-D**) auf Seite 158). Die Porositäten aller Monolithe lagen bei 75 Vol.-% eingesetztem Porogenanteil wie erwartet im Bereich von 63-70 % und unterschieden sich nicht von der Porosität des GE-500-Monoliths (66 %). Eine auffällige Reduzierung der Porosität von 70 auf 59 % ergab sich bei Zunahme des BDE-Anteils von 50 auf 60 %.

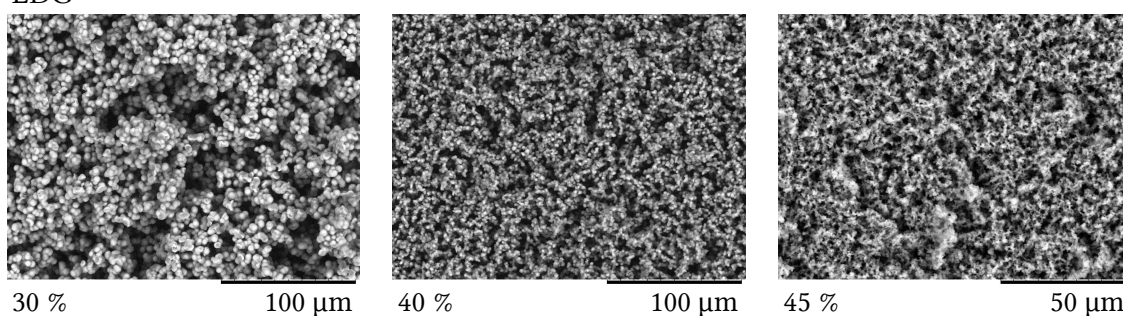
Die Porengröße sank, wie schon auf den ESEM-Aufnahmen zu erkennen war, generell mit steigendem Diepoxidanteil in der Monomermischung. Dieser Trend kann, wie bereits erläutert, durch die später eingetretene Phasenseparation aufgrund der mit steigendem Comonomeranteil hydrophiler werdenden Polymere erklärt werden. Im Fall von BDG und EDG waren die Porengrößen der Monolithe mit Anteilen bis 20 % im Vergleich zum GE-500-Monolith ( $12\text{ }\mu\text{m}$ ) größer. Erst ab 20 % sanken sie stetig und bei 30 % BDG lagen sogar drei Porengrößen nebeneinander vor. Die Porengröße der Monolithe lag bei keinem Anteil von BDG und EDG im Nanometerbereich und konnte im Vergleich zu der des GE-500-Monoliths in etwa nur halbiert werden. Die spezifische Oberfläche wurde dadurch auch nicht signifikant gesteigert. Durch 5-35 %ige Beimischungen von BDE fiel die Porengröße ebenfalls größer als beim GE-500-Monolith aus und veränderte sich mit steigendem Anteil bis 35 % kaum. Bei 35 und 40 %igem Anteil lagen bimodale Verteilungen mit ca. 12 und 5 bzw.  $7\text{ }\mu\text{m}$  großen Poren vor. Mit der Steigerung des Anteils auf 50 % sank die Porengröße jedoch beachtlich auf 800 nm und halbierte sich bei 60 %igem Anteil nochmals auf 400 nm. Parallel stieg die spezifische Oberfläche von ca.  $8\text{ m}^2\text{ g}^{-1}$  bei 40 %igem Anteil auf ca. 15 bzw.  $22\text{ m}^2\text{ g}^{-1}$  bei Anteilen von 50 und 60 %.

Bei einem 60 %igen Anteil von BDE an der Monomermischung mit GE 500 reduzierte sich im Vergleich zum GE-500-Monolith die Porengröße letztlich um den Faktor 30 und die spezifische Oberfläche verdreifachte sich auf  $22\text{ }\mu\text{m}^2\text{ g}^{-1}$  bei gleichbleibend hoher Porosität von ca. 60 %. Die Nanometer großen Poren schienen zudem nicht in einem geschlossenen Porensystem vorzuliegen. Wäre dies der Fall gewesen, wären sie bei den Porosimetriemessungen nicht erfasst und die Porosität wäre geringer bestimmt wor-

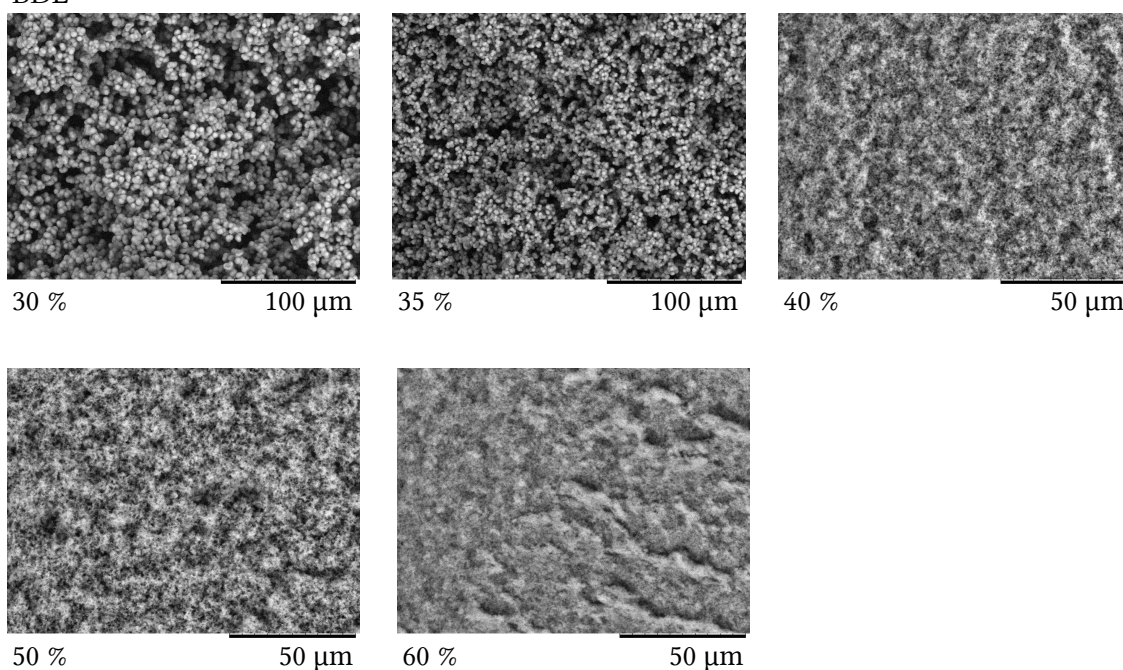
BDG



EDG

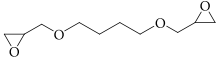
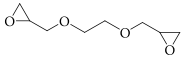



BDE



**Abbildung 4.32.** ESEM-Aufnahmen ausgewählter Monolithblöcke, die mit einem Monomergemisch, bestehend aus **GE 500** und 1,4-Butandiolglycidylether (**BDG**), Ethylenglycoldiglycidylether (**EDG**) oder 1,3-Butadiendiepoxid (**BDE**) als Comonomer mit variierendem Anteil und 1,25 Vol.-% Bortrifluoridetherat (1:10) als Katalysator in 75 Vol.-% Porogen (1,4-Dioxan/Methyl-*tert*-butylether (MTBE) (2:3)) hergestellt wurden.

**Tabelle 4.7.** Poröse Eigenschaften von Monolithen, die mit **GE 500** und den Diepoxiden 1,4-Butandiol diglycidylether (**BDG**), Ethylenglycoldiglycidylether (**EDG**) bzw. 1,3-Butadiendiepoxid (**BDE**) mit variierendem Anteil hergestellt wurden.

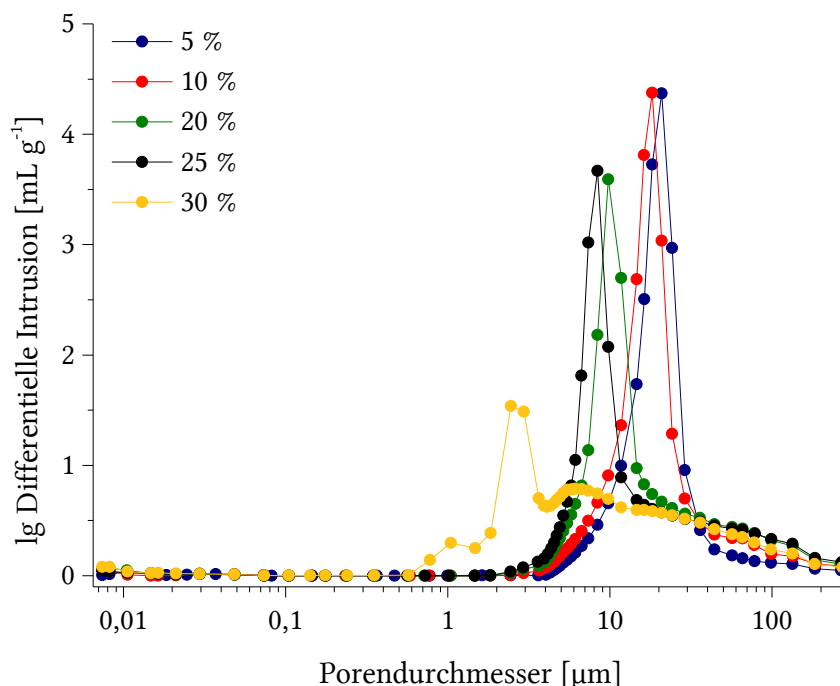
Porosität [%]			
Diepoxidanteil [Vol.-%]	BDG 	EDG 	BDE 
5	63 ± 3	65 ± 4	66 ± 4
10	66 ± 3	65 ± 3	65 ± 4
20	66 ± 3	64 ± 3	67 ± 4
25	64 ± 3	-	-
30	63 ± 3	63 ± 3	68 ± 3
35	-	-	68 ± 3
40	-	64 ± 3	70 ± 3
50	-	-	70 ± 4
60	-	-	59 ± 4

Porengröße [µm]			
Diepoxidanteil [Vol.-%]	BDG	EDG	BDE
5	20,8 ± 0,4	20,9 ± 0,4	14,7 ± 0,3
10	18,3 ± 0,4	11,7 ± 0,2	16,3 ± 0,3
20	9,8 ± 0,2	9,8 ± 0,2	14,6 ± 0,3
25	8,4 ± 0,2	-	-
30	6,1 ± 0,1	8,4 ± 0,2	16,3 ± 0,3
	2,5 ± 0,1	5,2 ± 0,1	
	1,0 ± 0,1		
35	-	-	11,7 ± 0,2
			4,5 ± 0,1
40	-	5,5 ± 0,1	11,7 ± 0,2
			6,7 ± 0,1
50	-	-	0,8 ± 0,1
60	-	-	0,4 ± 0,1

spezifische Oberfläche [m <sup>2</sup> g <sup>-1</sup> ]			
Diepoxidanteil [Vol.-%]	BDG	EDG	BDE
5	4,5 ± 0,1	3,3 ± 0,1	3,9 ± 0,1
10	3,8 ± 0,1	4,9 ± 0,1	3,7 ± 0,1
20	7,6 ± 0,2	6,1 ± 0,2	4,0 ± 0,1
25	5,6 ± 0,2	-	-
30	9,1 ± 0,3	7,0 ± 0,2	4,7 ± 0,1
35	-	-	4,7 ± 0,1
40	-	6,0 ± 0,2	8,2 ± 0,2
50	-	-	15,2 ± 0,4
60	-	-	22,3 ± 0,6

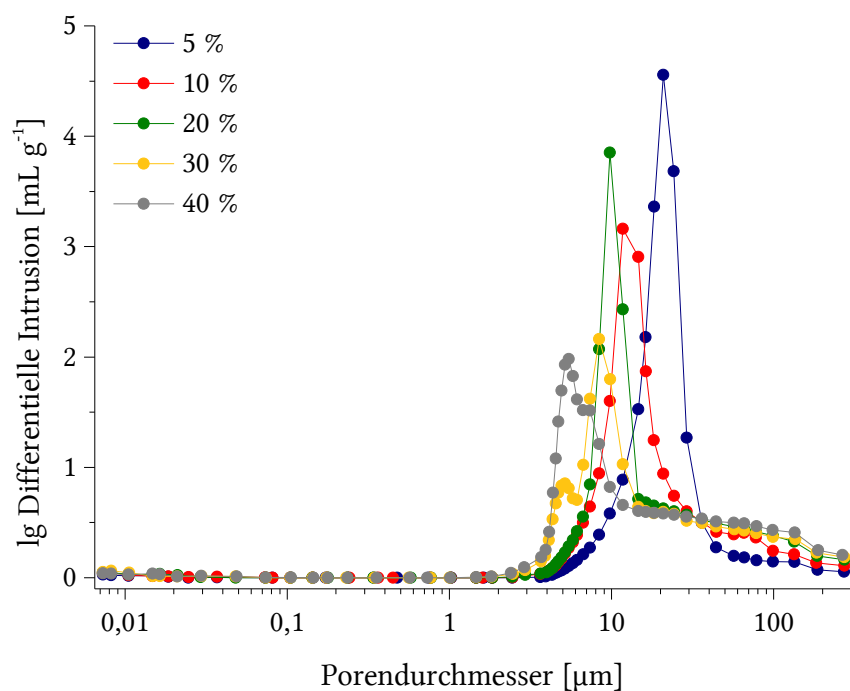


**Abbildung 4.33.** Porengrößenverteilungen (0,005-200 MPa) von Monolithen, hergestellt mit **GE 500** und 1,4-Butandiolglycidylether (**BDG**) als Comonomer mit variierendem Anteil an 25 Vol.-% Gesamtmonomeranteil in 75 Vol.-% Porogen (1,4-Dioxan/Methyl-*tert*-butylether (MTBE) (3:2)) und 1,25 Vol.-% Bortrifluoridetherat (1:10) als Katalysator.

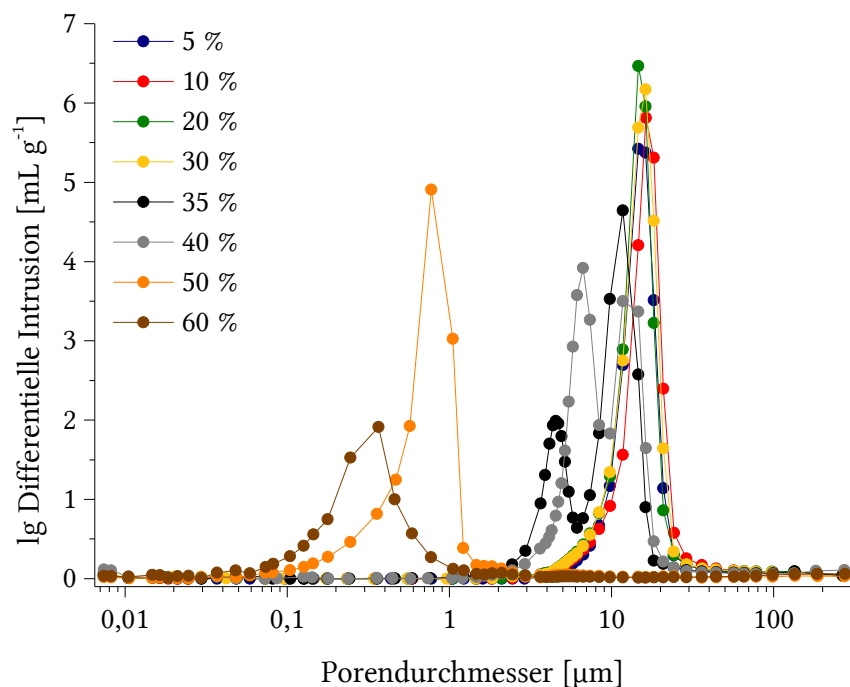
den. Eine Ursache kann die konstant gehaltene hohe Porosität sein. Durch den hohen „Lochanteil“ im Verhältnis zum niedrigeren „Feststoffanteil“ können die kleineren Poren miteinander verbunden werden. Bei den Monolithsynthesen mit GE 500 konnte sich im Gegensatz dazu mit den kleiner werdenden Poren ein geschlossenes System ausbilden (vgl. Abbildung 4.19 auf Seite 109), weil durch die Reduzierung des Porogenvolumenanteils entsprechend die Porosität, also der „Lochanteil“ im Verhältnis zum „Feststoffanteil“, abnahm.

In Kombination mit den Ergebnissen der Härtemessung (vgl. Abschnitt B bzw. 4.4.2 auf Seite 111 bzw. 127) lässt sich außerdem feststellen, dass die Rigidität hauptsächlich von der Porosität und nicht vom Porendurchmesser abhängig war. Diese unterschied sich nicht bedeutsam innerhalb einer Versuchsreihe, in der nach den Porosimetriemessungen die Porosität ähnlich hoch war, sich die Porengröße jedoch änderte.

Zusammenfassend führte die Beimischung der drei Diepoxide als Comonomere ab einem jeweils bestimmten Anteil zu einer Verkleinerung der Poren bei gleichbleibend hoher Porosität von durchschnittlich 65 % im Vergleich zum bisherigen Material, das mit 25 Vol.-% reinem GE 500 hergestellt wurde. Eine deutliche Verbesserung des Materials wurde mit den Mischungen mit 50 bzw. 60 % Anteil an BDE erreicht. Die Porengröße lag hierbei im



**Abbildung 4.34.** Porengrößenverteilungen (0,005-200MPa) von Monolithen, hergestellt mit **GE 500** und Ethylenglycoldiglycidylether (**EDG**) als Comonomer mit variierendem Anteil an 25 Vol.-% Gesamtmonomeranteil in 75 Vol.-% Porogen (1,4-Dioxan/Methyl-*tert*-butylether (MTBE) (3:2)) und 1,25 Vol.-% Bortrifluoridetherat (1:10) als Katalysator.



**Abbildung 4.35.** Porengrößenverteilungen (0,005-200MPa) von Monolithen, hergestellt mit **GE 500** und 1,3-Butadiendiepidox (**BDE**) als Comonomer mit variierendem Anteil an 25 Vol.-% Gesamtmonomeranteil in 75 Vol.-% Porogen (1,4-Dioxan/Methyl-*tert*-butylether (MTBE) (3:2)) und 1,25 Vol.-% Bortrifluoridetherat (1:10) als Katalysator.



**Abbildung 4.36.** Monolithdisk ( $7 \times 2$  mm, 77  $\mu$ L) in Inline-Solvent-Filter, die mit **GE 500** und 60 % 1,3-Butadiendiepoxid (**BDE**) in 75 Vol.-% Porogen (1,4-Dioxan/Methyl-*tert*-butylether (MTBE) (3:2)) und 1,25 Vol.-% Bortrifluoridetherat (1:10) als Katalysator hergestellt wurde, ca. 19 Wochen nach ihrer Präparation.

dreistelligen Nanometerbereich und der 60 %ige Anteil führte zu einer Verdreifachung der bisherigen spezifischen Oberfläche bei gleichzeitiger 1,6-fachen Steigerung der Rigidität (vgl. Abschnitt 4.4.2 auf Seite 127). Im Folgenden wurden Monolithdisks mit diesem Material hergestellt, um zu untersuchen, ob durch die erhöhte spezifische Oberfläche auch eine signifikante Kapazitätssteigerung erzielt werden konnte.

#### 4.4.4 Affinitätsexperiment

Monolithdisks ( $7 \times 2$  mm, 77  $\mu$ L) wurden analog zu der in Abschnitt 4.3.3 auf Seite 112 beschriebenen Technik mit GE 500 und 60 % BDE in 75 Vol.-% Porogen in Inline-Solvent-Filtern hergestellt. Die Disks hafteten teilweise so stark im Filter, dass sie für die Funktionalisierung nicht herausgedrückt werden konnten. Durch die höhere Rigidität des GE 500/BDE-Monoliths (nach SHORE A: 61) und/oder durch die Adhäsion an die Filterwand schrumpften sie eventuell auch nicht so stark im Vergleich zu den ausschließlich mit GE 500 präparierten Disks. In Abbildung 4.36 ist exemplarisch ein Foto einer Monolithdisk nach 132 Tagen (ca. 19 Wochen) gezeigt (vgl. Abbildung 4.25 auf Seite 116).

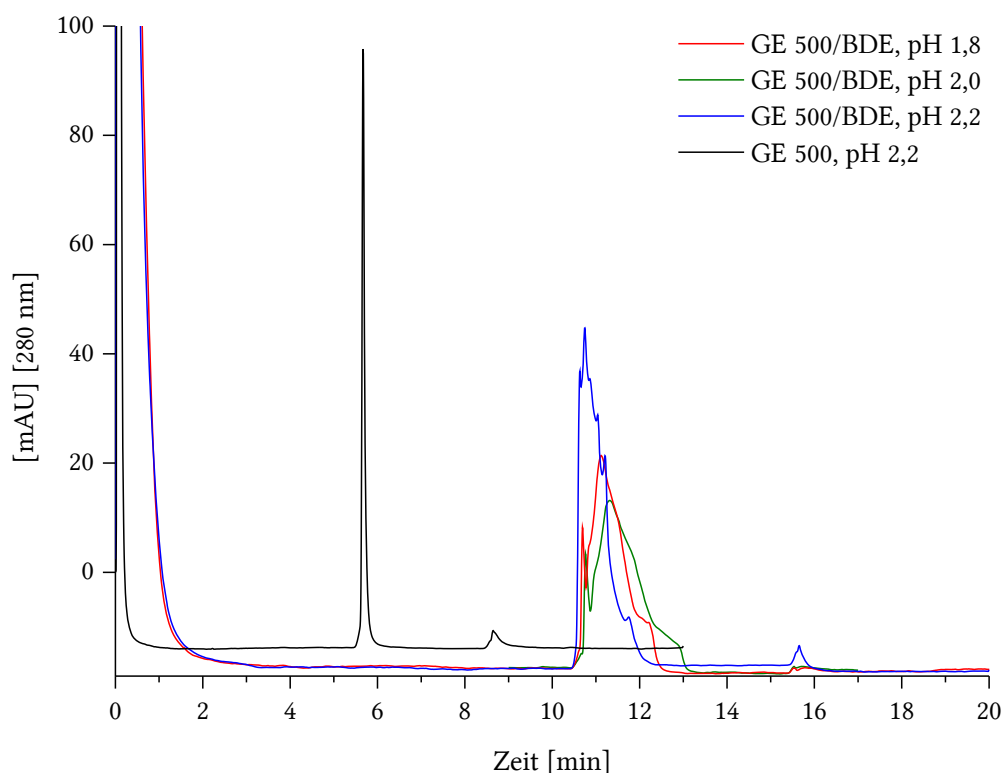
Die Monolithdisks wurden nach den Ergebnissen mit den GE-500-Disks mit rekombinantem Protein A mittels SCHIFFScher-Base-Methode funktionalisiert. Die Signale, die zuvor mit diesen Disks erhalten wurden, waren die symmetrischsten und die Kapazität der Disks unterschied sich im Vergleich zu denen, die mittels der Epoxid-Methode funktionalisiert wurden, nicht (vgl. Abschnitt 4.3.4 auf Seite 115). Die Immobilisierung erfolgte nun aber bei pH 11 ( $pK_S$ -Wert ( $\epsilon$ -( $\text{NH}_3^+$ )) 10,28<sup>[362]</sup> von Lysin). Der höhere pH-Wert führte bei der Epoxid-Methode zu schlechteren Kapazitäten im Vergleich zur Immobilisierung bei niedrigeren pH-Werten. Die SCHIFFSche-Base-Reaktion wird bei schwächeren Nukleophilen durch BRØNSTED-Säuren beschleunigt. Mit Aminen als Nukleophile kann sie aber zumindest im schwach Basischen durchgeführt werden<sup>[166]</sup>.

Die Injektion des Kaninchenserums (1:5 in PBS, pH 7,6) erfolgte wie bei den Experimenten mit den GE-500-Disks manuell und die Flussrate betrug auch hier  $2 \text{ mL min}^{-1}$ . Trotz kleinerer Poren (400 nm) bei etwa gleich hoher Porosität (59 %) wiesen die Disks mit 56 bar (5,6 MPa) als Gegendruck wiederum nur den Systemdruck auf. Dies sprach sehr dafür, dass der Eluent durch vorhandene Spalten ungehindert floss. Für die Elution wurde zunächst wieder eine Glycin-HCl-Lösung mit pH 2,2 eingesetzt. Im Chromatogramm in Abbildung 4.37 ist allerdings eine sehr breite und unsymmetrische Signalform zu erkennen, vor allem im Vergleich zum Signal der GE-500-Disk. Das Signal war mehr als doppelt so breit (2 min). Der pH-Wert wurde daraufhin auf 2,0 und 1,8 bei konstant gehaltener Flussgeschwindigkeit reduziert, woraufhin die Signale aber nicht schmaler wurden. Eventuell liegt die verzögerte Elution an einem durch die kleineren Poren (400 nm) entstandenen gewundenen Porensystem, das das eluierte IgG erschwerter passierte als die  $12 \mu\text{m}$  großen Durchflusssporen der GE-500-Disks.

Die Kapazität (vgl. Abbildung 3.2 (B) auf Seite 79) nahm innerhalb von drei Messungen bei der Elution mit pH 2,2 nicht ab. Sie betrug  $0,90 \text{ mg mL}^{-1}$ . Auch bei pH 2,0 nahm sie von  $0,90 \text{ mg mL}^{-1}$  auf  $0,8 \text{ mg mL}^{-1}$  nur geringfügig ab. Die gemessene Kapazität über sechs Messungen hinweg stabil. Bei pH 1,8 halbierte sie sich nach drei Messungen allerdings auf  $0,4 \text{ mg mL}^{-1}$  und bei der vierten Messung nochmals auf  $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$ . Bei einem pH-Wert unter 2,0 schien entweder die kovalente Bindung zwischen rekombinantem Protein A und Monolith zerstört bzw. das Protein denaturiert und somit die Konzentration an aktivem Protein reduziert worden zu sein.

Die Disk wies im Vergleich zu den GE-500-Disks eine etwa 5-fach höhere Kapazität auf, obwohl die Injektion des Serums wieder manuell erfolgte. Die Einflüsse der Porenstruktur und der abgeänderten Funktionalisierungsbedingungen ließen sich nicht genau bestimmen. Ein wichtiger Grund für die Kapazitätssteigerung wird aber die im Vergleich 3-fach höhere Oberfläche gewesen sein.

Die Effizienz einer entwickelten monolithischen Phase mittels Affinitätsexperiment über die isolierbare Menge an Analyt zu testen, ist wegen der Funktionalisierung mittels Protein A relativ kostenintensiv und beansprucht insgesamt viel Zeit. Außerdem wäre eine wichtige Charakterisierung des Materials die Menge an immobilisiertem Ligand, die im Folgenden als Proteinbindungskapazität bezeichnet wird, zu bestimmen und dadurch auch die Reproduzierbarkeit der Herstellung zu überprüfen. Dazu eignet sich als Modellprotein Rinderserumalbumin (engl. *Bovine Serum Albumin*, BSA), da es zum einen kostengünstig zu erwerben und zum anderen gut charakterisiert ist. Die Proteinbindungskapazität könnte schließlich mit der im Affinitätsexperiment bestimmten Kapazität in Relation gesetzt werden, um zu untersuchen wieviel Analyt pro immobilisiertem Ligand isoliert werden kann.



**Abbildung 4.37.** Chromatogramm von eluiertem Immunglobulin G (IgG) aus Kaninchenserum (1:2 in PBS, pH 7,6), Chromatographische Bedingungen: Monolithdisk ( $7 \times 2$  mm,  $77 \mu\text{L}$ ), die mit **GE 500** und 60 % 1,3-Butadiendiepoxid (**BDE**) an 25 Vol.-% Gesamtmonomeranteil in 75 Vol.-% Porogen (1,4-Dioxan/Methyl-*tert*-butylether (MTBE) (3:2)) und 1,25 Vol.-% Bortrifluoridetherat (1:10) als Katalysator hergestellt und mittels SCHIFFScher-Base-Methode funktionalisiert wurde, Flussrate  $2 \text{ mL min}^{-1}$ , manuelle Injektion von  $1000 \mu\text{L}$  Serum (1:2),  $\lambda = 280 \text{ nm}$ , Waschpuffer PBS (A, pH 7,6), Elutionslösung Glycine-HCl (B, pH 2,2/2,0/1,8), 10 min A, 5 min B, 5 min A. Daneben zum Vergleich das Chromatogramm der Monolithdisk, die nur mit GE 500 (25 Vol.-%) hergestellt und mittels SCHIFFScher-Base-Methode funktionalisiert wurde (vgl. Abbildung 4.27 (B) auf Seite 120).

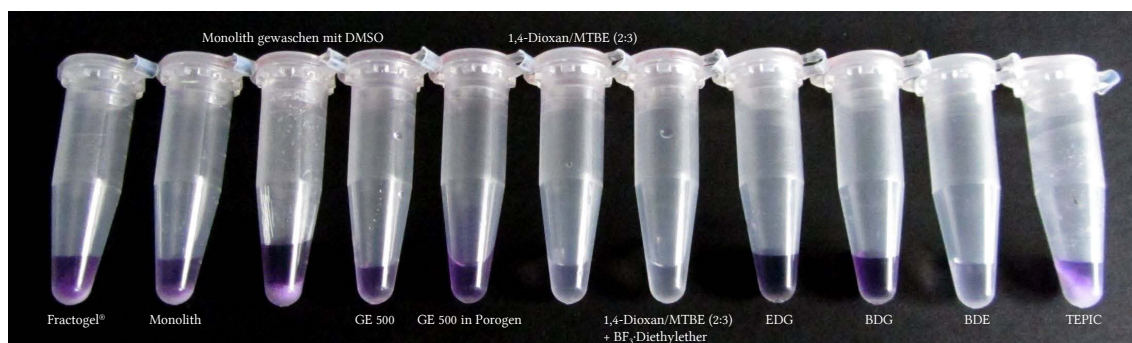
#### 4.4.5 Bestimmung der Proteinbindungskapazität

Für die Bestimmung der Proteinbindungskapazität mittels der Differenzmethode, bei der die Konzentrationsabnahme des Proteins in der Immobilisierungslösung verfolgt wird, war bei gegebener Kapazität von  $0,90 \text{ mg mL}^{-1}$  die Abnahme der eingesetzten Proteinkonzentration ( $5 \text{ mg mL}^{-1}$ ) zu gering. Deshalb sollte sie, wie in der Literatur für Epoxid-funktionalisierte Monolithe beschrieben<sup>[338,364,365]</sup>, mit einem BCA-Test ermittelt werden. Als Modellprotein wurde BSA gewählt. Der Vorteil eines Bradford-Tests gegenüber Reagenzien, die direkt mit dem nachzuweisenden Protein einen farbigen Komplex bilden, ist, dass der violette Komplex zwischen BCA und den durch das Protein reduzierten

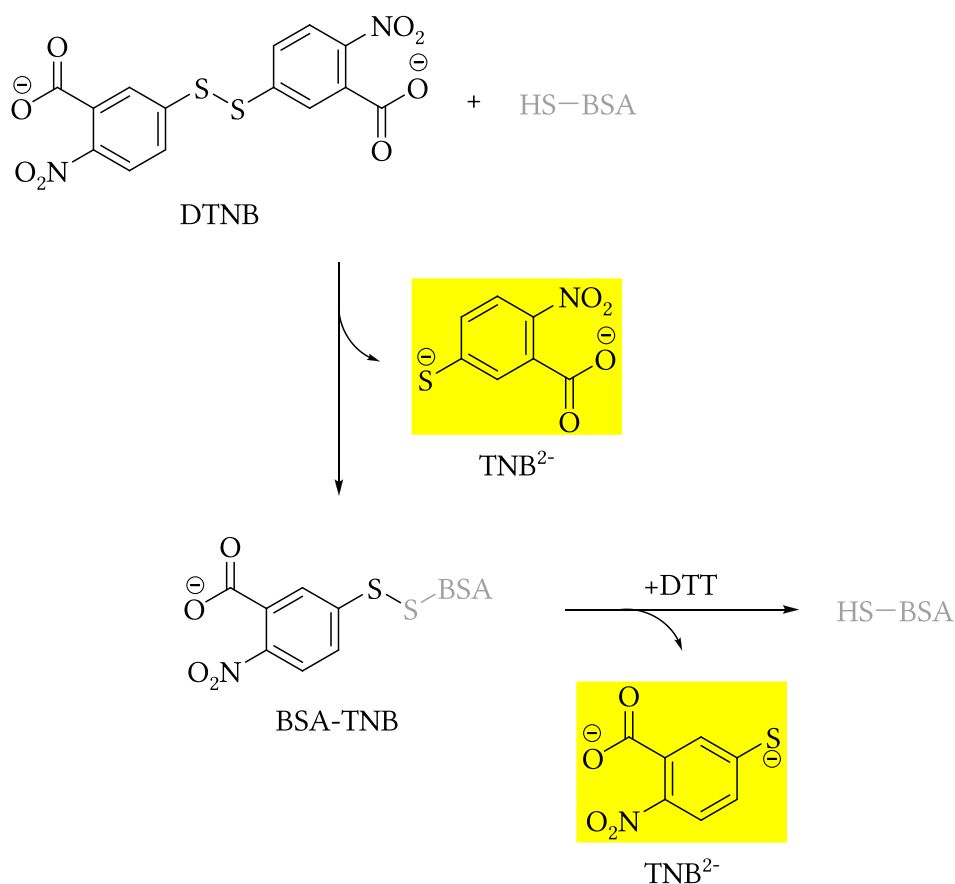


Kupfer(I)-Ionen in Lösung entsteht. Hierdurch muss die Quantifizierung der Färbung nicht mit dem Feststoff durchgeführt werden, sondern kann photometrisch in Lösung erfolgen. Bei dem Test mit dem unfunktionalisierten Monolith stellte sich aber heraus, dass schon dieser eine starke Violett färbung hervorrief. Daraufhin wurde der Test mit Fractogel® EMD Epoxy (M), einem kommerziell erhältlichen epoxidbasierten Methacrylatharz und den Epoxidmonomeren TEPIC, GE 500, BDG, EDG sowie BDE durchgeführt. Dabei interagierten alle Substanzen. Die Lösungen waren, wie auf dem Foto in Abbildung 4.38 zu sehen, bis auf die mit BDE, intensiv violett gefärbt. Die Porogene 1,4-Dioxan und MTBE sowie der Katalysator Bortrifluoridetherat führten dagegen zu keiner Färbung. Einen störenden Einfluss haben auch alle Substanzen, die reduzierend wirken. Welche funktionelle Gruppe bzw. welche Verunreinigung im Fall der Epoxidmonomere, des Monoliths und von Fractogel® interferierte, wurde nicht genauer untersucht. Die Absorption als Hintergrund von der des funktionalisierten Materials zu subtrahieren, wie es in der Literatur beschrieben ist, wäre aber nach WIECHELMANN et al.<sup>[366]</sup> ungenau. Denn ihren Studien zufolge setzt sich die Farbintensität nicht additiv aus den sie induzierenden Einzelredoxreaktionen zusammen. Interferenzen können demnach nicht vereinfacht durch eine Subtraktion des Hintergrunds kompensiert werden.

Deshalb wurde daraufhin begonnen, eine neue Methode aber wieder mit BSA als Modellprotein zu entwickeln<sup>[367]</sup>. Die Idee ist in Abbildung 4.39 veranschaulicht. BSA wird mit 5,5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoesäure) (DTNB), das unter dem Namen ELLMAN-Reagenz und für den Nachweis von Thiolen bekannt ist, in einer Thiol-Disulfid-Austauschreaktion funktionalisiert. Das in der Reaktion freigesetzte 2-Nitro-5-thiobenzoat ( $\text{TNB}^{2-}$ ) muss abgetrennt werden. Das Rinderserumalbumin-Nitrothiobenzoatesäure-Konjugat (BSA-TNB) wird schließlich auf dem Trägermaterial kovalent immobilisiert und  $\text{TNB}^{2-}$  durch Zugabe von Dithiothreitol (DTT) reduktiv abgespalten. TNB ( $\text{p}K_s = 4,41$ ) liegt im Neutralen deprotoniert ( $\text{TNB}^{2-}$ ) vor und kann bei seiner maximalen Absorption bei 412 nm photo-



**Abbildung 4.38.** Bicinchoninsäure-Tests (BCA-Tests) mit den angegebenen Lösungen und Substanzen.



**Abbildung 4.39.** Synthese des Rinderserumalbumin-Nitrothiobenzoessäure-Konjugats (BSA-TNB) in einer Thiol-Disulfid-Austauschreaktion zwischen Rinderserumalbumin (engl. *Bovine Serum Albumin*, BSA) und 5,5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoessäure) (DTNB) unter Abspaltung von 2-Nitro-5-thiobenzoat (TNB<sup>2-</sup>) sowie die reduktive Abspaltung des zu quantifizierenden 2-Nitro-5-thiobenzoats mit Dithiothreitol (DTT).

metrisch quantifiziert werden. Für die Funktionalisierung wurde angenommen, dass ein Cysteinrest (Cys-34) der insgesamt 35 im BSA gebundenen Cysteine nicht in einer Disulfidbrücke gebunden ist<sup>[368]</sup> und für die Kopplung des Farbstoffs zur Verfügung steht. Zur Überprüfung der Kopplungsdichte wurde die Absorption der Konjugatlösung nach reduktiver Farbstoffabspaltung mit der einer Cystein-TNB-Lösung gleicher Stoffmengenkonzentration verglichen. Die Absorption der Konjugatlösung war um das 1,5-fache höher. Das bedeutete, dass durchschnittlich mehr als ein Farbstoffmolekül an einem BSA-Molekül gebunden war. Erklärbar ist dies durch Bindung von TNB-Molekülen in Bindungstaschen des BSA, die im Organismus dem Transport von Fettsäuren dienen<sup>[369]</sup>. Daneben war es auch möglich, dass kein TNB-Molekül koppelte, weil der freie Cysteinrest bereits im Blut des Organismus, aus dem es gewonnen wurde, mit beispielsweise Cystein reagiert hat. Da die nur einfache Kopplung eines jeden BSA-Moleküls mit TNB

nicht gewährleistet war, handelte es sich um eine Relativmethode, deren Quantifizierung über eine Kalibrierung mit der jeweiligen Konjugatlösung erfolgen musste.

Die Funktionalisierung der Monolithe wurde bisher mittels der Epoxid- oder SCHIFF-schen-Base-Methode durchgeführt. Das Konjugat sollte zur Vergleichbarkeit unter gleichen Bedingungen immobilisiert werden, sodass seine Stabilität unter diesen gewährleistet sein musste. Es wurde die Beständigkeit bei unterschiedlichen pH-Werten und in Gegenwart von Natriumcyanoborhydrid untersucht, das bei der reduktiven Aminierung bei der SCHIFF-schen-Base-Methode eingesetzt wird. Das Konjugat verhielt sich wie erwartet identisch zu DTNB, mit dem der Versuch ebenfalls durchgeführt wurde. Beide waren bis pH 9 stabil. Bei pH 10 wurde die Disulfidbrücke gespalten. Die Absorption bei pH 10 betrug beim Konjugat 0,05 und vervierfachte sich nach 2 h auf 0,19. Bei DTNB lag die Absorption nach sofortiger Messung bei nur 0,01, vervierfachte sich aber nach 2 h auf 0,11. Eine Funktionalisierung im Basischen ab pH 10 wäre somit nicht möglich.

In Gegenwart von Natriumcyanoborhydrid war eine stetige Erhöhung der Absorption nach sofortiger Messung von 0,01 bei pH 3 auf 0,02 bei pH 7 zu verzeichnen. Über einen Zeitraum von 2 h verdoppelte bzw. vervierfachte sie sich auf maximal 0,092 bei pH 7. Ab pH 8 nahm die Absorption jedoch sprunghaft nach sofortiger Messung auf 0,14 zu und verdoppelte sich nochmal bis pH 10 auf 0,28. Nach 2 h betrug sie schon 0,34 bei pH 8 und 0,44 bei pH 10. Die Disulfidbrücke wurde demnach von Natriumcyanoborhydrid reduziert. Von der Stabilität von DTNB wurde auf die des Konjugats geschlossen. Dieses kann infolgedessen in keiner Reaktion verwendet werden, in der auch Natriumcyanoborhydrid eingesetzt wird. Eine weitere und maßgebliche Limitierung zeigte sich bei Zugabe des Konjugats zu Fractogel®, das als Testmaterial eingesetzt wurde. Nach Zugabe von DTT zur reduktiven Abspaltung verfärbte sich die Lösung erwartungsgemäß gelb, entfärbte sich aber hierauf zusehends. Es kann vermutet werden, dass das freigesetzte  $\text{TNB}^{2-}$  über seine Thiolatfunktion die nicht reagierten Epoxidgruppen nukleophil angreift. Eine Quantifizierung war infolgedessen nicht möglich und die Methode zumindest mit TNB als Farbstoff für epoxidbasierte Trägermaterialien ungeeignet. Folglich konnte die Proteinbindungskapazität im Rahmen dieser Arbeit nicht bestimmt, sondern nur die isolierbare Analytmenge im Affinitätsexperiment ermittelt werden.

DTNB könnte aber zur Überprüfung der Effizienz von Blockingreagenzien für epoxidbasierte Materialien eingesetzt werden. Das geblockte Material würde mit einer Lösung von  $\text{TNB}^{2-}$  (DTNB + DTT) versetzt. Dieses würde mit ungeblockten Epoxidgruppen reagieren und die Abnahme der Absorption entspräche der ungeblockten Epoxidmenge. Dies wäre eine durchaus bedeutsame und gleichzeitig einfach durchzuführende Anwendung, weil das Blocking von Trägermaterialien in der Affinitätschromatographie zur Vermeidung unspezifischer Bindungen eine wichtige Rolle spielt.

## 4.5 Überblick über hergestellte monolithische Phasen

In der vorliegenden Arbeit wurden erstmals mit den polyfunktionellen Glycidylethern  $\alpha$ -TEPIC und GE 500, sowie mit GE 500 in Mischung mit dem Diepoxid 1,3-Butadiendiepoxyd (BDE) unterschiedliche monolithische Phasen durch die Autopolymerisation ihrer Epoxidgruppen hergestellt.

Die Präparationen mit TEPIC gestalteten sich aufgrund einer notwendig hohen Reaktionstemperatur von 90 °C als diffizil. Dennoch gelang die blasenfreie Präparation von Monolithkapillarsäulen in FEP-Schläuchen mit Durchmessern von 0,8 mm in einem angefertigten Aluminiumheizblock. Die Säulen wiesen bei einer Porosität von 55 % 4  $\mu$ m große Poren auf und besaßen eine spezifische Oberfläche von 2 m<sup>2</sup> g<sup>-1</sup>, die in der Größenordnung von Hosoya et al.<sup>[192]</sup> hergestellten TEPIC-Monolithen (3 m<sup>2</sup> g<sup>-1</sup>) lagen. Die Präparationstechnik ließ sich allerdings nicht auf die Säulenherstellung in Edelstahlkapillaren oder PEEK-Kapillaren übertragen. Problematisch war hierbei der Verschluss der Kapillaren. Da sich FEP als Säulenmantel für Affinitätsexperimente nicht eignete, wurden die Phasen nicht im Affinitätsexperiment verwendet.

Stattdessen wurden monolithische Phasen mit GE 500 als Monomer sowohl im Kapillar- (60  $\times$  0,5 mm, OD 1/16", 12  $\mu$ L) als auch im Diskformat (7  $\times$  2 mm, 77  $\mu$ L) bei Raumtemperatur hergestellt, mit rekombinantem Protein A funktionalisiert und im Affinitätsexperiment eingesetzt. Die Disks wurden in einem dafür umfunktionierten Inline-Solvent-Filter *in situ* hergestellt, mit dem sie an die HPLC-Anlage angeschlossen werden konnten. Die Präparation gelang nach Optimierung fehlstellen- und blasenfrei, ohne nötige vorangehende Entgasung der Polymerisationslösung. Die Monolithe wiesen eine hohe Porosität von 66 % und 12  $\mu$ m große Poren auf. Ihre spezifische Oberfläche betrug 7 m<sup>2</sup> g<sup>-1</sup>. Nach Funktionalisierung der Monolithkapillarsäule mittels der Epoxid-Methode wurde nachweislich IgG aus der sehr komplexen Probe Kaninchenserum isoliert. Als Kapazität wurden 0,44 mg mL<sup>-1</sup> bestimmt. Bei Funktionalisierung der Monolithe im Diskformat mittels der Epoxid-Methode bei pH 11 reduzierte sich die Kapazität um den Faktor sieben und bei Funktionalisierung bei pH 8 bzw. mittels SCHIFFScher-Base-Methode halbierte sie sich. Dies kann eventuell auf eine unzureichende manuell durchgeführte Beladung mit dem Serum zurückgeführt werden. Bei pH 11 können die Epoxidgruppen durch Reaktion mit Hydroxidionen für die Kopplung inaktiviert und/oder das Protein kann durch den hohen pH-Wert denaturiert worden sein. Die erzielte Kapazität war im Vergleich zu der von z. B. sepharosebasierten Materialien (20 mg mL<sup>-1</sup> P3391, Sigma) und der von GMA/EDMA-basierten CIM<sup>®</sup> r-Protein A Disks ( $\geq$  10 mg mL<sup>-1</sup>) von BIA Separations d.o.o. (Ajdovščina, Slovenien)<sup>[370]</sup> gering.

Durch Beimischung von 60 % BDE als Comonomer zu GE 500 konnte das Material hinsichtlich der Porengröße und spezifischen Oberfläche optimiert werden. Bei höheren Anteilen an BDE verdichteten sich hingegen die zuvor noch phasenseparierten Monolithe nach Trocknung zu stark und kamen daher als chromatographische Phase nicht mehr in Frage. Insgesamt wurde der Epoxidgehalt durch den 60 %igen Anteil an BDE vervierfacht. Die Porengröße wurde um den Faktor 30 auf 400 nm reduziert und die spezifische Oberfläche um das 3-fache auf  $22 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$  bei nahezu gleichbleibend hoher Porosität von 59 % gesteigert. Die Poren waren somit kleiner als die der kommerziell zu erwerbenden CIM<sup>®</sup> Protein A Disks von BIA Separations, die mittlere Porengrößen<sup>[370]</sup> im Bereich von 1,2-1,5  $\mu\text{m}$  aufweisen. Ein Vergleich der spezifischen Oberfläche ist aufgrund fehlender Angabe<sup>[370]</sup> nicht möglich. Die Kapazität konnte mit dem GE 500/BDE-Monomergemisch auf ca.  $1 \text{ mg mL}^{-1}$  verdoppelt werden. Sie war über sechs Messungen bei eingeschlossener pH-Wert-Reduzierung für die Elution von 2,2 auf 2,0 stabil, brach aber bei Elution mit einem pH-Wert unter 2,0 ein. Im Vergleich zu den mittels der CDI-Methode funktionalisierten Disks von BIA Separations ist dies noch relativ gering. Dabei muss aber beachtet werden, dass die Kapazität durch Optimierung der Beladung und Funktionalisierungsbedingungen gesteigert werden könnte. Den Einfluss der Funktionalisierungsbedingungen für CIM<sup>®</sup> Disks zeigen die Arbeiten der Gruppen von TENNIKOVA<sup>[358]</sup> aus dem Jahr 2000. In denen funktionalisierten sie eine CIM<sup>®</sup> Disk mittels Epoxid-Methode mit rekombinantem Protein A und erzielten eine Kapazität von  $1,95 \text{ mg IgG mL}^{-1}$ , die in der Größenordnung der mit den in dieser Arbeit hergestellten Disks erzielten Kapazität liegt. Außerdem wurde die Kapazität nicht durch Verwendung von aufgereinigtem IgG<sup>[370]</sup> sondern durch Isolierung von IgG aus Kaninchenserum, einer der komplexesten Proben, bestimmt. Im Gegensatz zu GMA/EDMA-Monolithen, die in einer Radikalkettenpolymerisation hergestellt werden und die Epoxidfunktionalität dabei durch GMA in den Monolith eingebracht wird, wurden die Epoxidgruppen bei den GE 500/BDE-Monolithen sowohl für die Polymerisation als auch für die Funktionalisierung genutzt. Unter diesen Gesichtspunkten ist die erzielte Kapazität für die anfängliche Entwicklung sehr zufriedenstellend.

Um IgG in analytischen Mengen aus einer auch komplexen Probenmatrix wie z.B. Blutserum anzureichern, können die in dieser Arbeit entwickelten Monolithe durchaus eingesetzt werden. Die Kapazität des so weit entwickelten Monoliths könnte durch eine nachträgliche polyfunktionelle Beschichtung, mit der zusätzliche funktionalisierbare Gruppen eingebracht würden, erhöht werden. Somit könnten Monolithdisks mit erhöhter Kapazität eventuell auch mit TEPIC als Monomer und bisher optimierten Polymerisationsbedingungen hergestellt werden. Inline-Solvent-Filter lassen sich leichter und dichter als Edelstahlkapillaren verschrauben, sodass sich TEPIC-Disks unkomplizierter pro-

duzieren ließen als Kapillarsäulen. Weitere Arbeiten sollten sich aber zunächst mit der Abdichtung der Disk im Filter beschäftigen, sodass eine Spaltenbildung ausgeschlossen ist und der maximal anlegbare Druck bestimmt werden kann. Aufgrund der hohen Rigidität (nach SHORE A: 61) sollten sie aber unter hohen Flussraten, selbst wenn der Gegendruck durch eine bessere Abdichtung steigen sollte, eine gute Stabilität aufweisen. Der maximale Druck für die CIM® Disks beträgt zum Vergleich 50 bar (5 MPa)<sup>[370]</sup>. Im Weiteren kann nach Optimierung der Funktionalisierungsbedingungen die Effektivität des Blockings bezüglich der Vermeidung unspezifischer Bindungen mittels DTNB (vgl. Abschnitt 4.4.5 auf Seite 138) überprüft werden. Dieser wichtige Punkt ist für epoxidbasierte monolithische Phasen noch kaum untersucht.

## Kapitel 5

# Zusammenfassung und Ausblick

Im Gegensatz zu den in der Literatur überwiegend beschriebenen epoxidbasierten Glycidylmethacrylat (GMA)/Ethyldimethacrylat (EDMA)-Monolithen, die durch eine Radikalkettenpolymerisation synthetisiert werden, wurden in der vorliegenden Arbeit neuartige monolithische epoxidbasierte Phasen durch Autopolymerisation der Epoxidgruppen polyfunktioneller Glycidylether hergestellt. Für die nachfolgende Funktionalisierung mit rekombinantem Protein A wurden die bei der Polymerisation nicht verbrauchten Epoxidgruppen genutzt.

Die beiden als Monomere vorgesehenen polyfunktionellen Glycidylether Pentaerythritoltetraglycidylether und Glyceroltriglycidylether konnten in einer WILLIAMSONschen Ethersynthese mit Epichlorhydrin und dem entsprechenden Polyalkohol synthetisiert werden. Die Glycidylether wurden mit einer vergleichbaren Reinheit zu den kommerziell erwerblichen Monomeren erhalten, konnten aber nicht in für die Monolithsynthesen ausreichender Menge hergestellt werden. Die Monolithpräparationen wurden deshalb mit den drei kommerziellen Polyglycidylethern Tris(2,3-epoxypropyl)isocyanurat (TEPIC), Glyceroltriglycidylether (GE 100) und Polyglycerolpolyglycidylether (GE 500) durchgeführt.

Monolithsynthesen mit TEPIC wurden aufgrund des besseren Löslichkeitsverhalten mit dem Isomer  $\alpha$ -TEPIC durchgeführt. Die Abtrennung von  $\beta$ -TEPIC gelang durch selektives Lösen des Isomerengemisches in Chloroform bei Raumtemperatur. Es konnten nach Optimierung der Präparationstechnik, hinsichtlich Befüllung, Temperierung und Verschluss der Kapillaren, schließlich Monolithkapillarsäulen in FEP-Schläuchen (ID 0,8 mm) fehlerstellenfrei hergestellt werden. Sie wiesen eine Porosität von 55 %, 4  $\mu\text{m}$  große Poren und eine spezifische Oberfläche von 2  $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$  auf. Die Technik ließ sich aber nicht auf Kapillaren aus Edelstahl oder Polyetheretherketon (PEEK) übertragen. Aufgrund der begrenzten Löslichkeit von  $\alpha$ -TEPIC und der deshalb auch notwendig hohen Reaktions-

temperatur war die Variation der Porogenzusammensetzung und -menge zur Reduzierung der Porengröße bzw. zur Erhöhung der spezifischen Oberfläche beschränkt. Die Arbeiten wurden aus diesem Grund nicht weitergeführt.

Mit den Monomeren GE 100 und GE 500 konnten Monolithsynthesen hingegen bei Raumtemperatur durchgeführt werden. Die Synthesebedingungen und somit die Materialeigenschaften wurden beginnend mit einem Porogenscreening optimiert. Für beide Monomere ergab sich empirisch jeweils eine geeignete Mischung. Für GE 500, mit dem die Synthesen anschließend aufgrund der höheren Funktionalität weiterverfolgt wurden, setzte sich die Porogenmischung aus 1,4-Dioxan und Methyl-*tert*-butylether (MTBE) im Verhältnis 2:3 zusammen. Eine Phasenseparation wurde mit einem Mindestporogenanteil von 50 Vol.-% induziert. Die Bestimmung der porösen Eigenschaften bei Variation des Porogenanteils von 70 auf 80 Vol.-% erfolgte mittels Quecksilber-Intrusionsporosimetrie-messungen und paralleler Untersuchung der Morphologien mittels Environmental Scanning Electron Microscope (ESEM). Durch den steigenden Porogenanteil wurde die Porosität von 51 % auf 69 % gesteigert. Die Porengröße verzehnfachte sich von 1,9 auf 21,0  $\mu\text{m}$ , wobei sich die spezifische Oberfläche von 9 auf 5  $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$  aber etwa halbierte.

Mit dem Monolith, der mit 75 Vol.-% Porogen hergestellt wurde (66 %, 12  $\mu\text{m}$ , 7  $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$ ), wurde eine Monolithkapillarsäule (60  $\times$  0,5 mm, OD  $1/16''$ , 12  $\mu\text{L}$ ) in einer Edelstahlkapillare *in situ* hergestellt, die nach Funktionalisierung eine Kapazität von 0,44 mg IgG  $\text{mL}^{-1}$  aus Kaninchenserum aufwies.

Die Präparation im Diskformat (7  $\times$  2 mm, 77  $\mu\text{L}$ ) gelang *in situ* in umfunktionierten Inline-Solvent-Filtern, mit denen sie direkt an die HPLC-Anlage angeschlossen werden konnten. Es wurden Disks mit 70 und 75 Vol.-% Porogen hergestellt und mittels der Epoxid-Methode bei den pH-Werten 8 und 11 sowie mittels SCHIFFScher-Base-Methode funktionalisiert. Die Kapazitäten der beiden Materialien unterschieden sich bei gleicher Funktionalisierungsmethode nicht. Bei pH 11 können die Epoxidgruppen durch Reaktion mit Hydroxidionen inaktiviert und/oder das Protein kann denaturiert worden sein. Einen Kapazitätsunterschied zwischen Disks, die mittels SCHIFFScher-Base-Methode oder der Epoxid-Methode bei pH 8 funktionalisiert wurden, ergab sich nicht. Allerdings halbierte sich die Kapazität im Vergleich zur Monolithkapillarsäule, was eventuell auf eine zu geringe Beladung der Disk zurückzuführen war.

Die Kapazität konnte durch Beimischung von 60 % 1,3-Butadiendiepoxid (BDE) zu einem konstant gehaltenen 25 Vol.-%igen Gesamtmonomeranteil auf ca. 1 mg IgG  $\text{mL}^{-1}$  verdoppelt werden. Der Epoxidgehalt wurde durch das Comonomer vervierfacht. Die mit dem Monomergemisch hergestellte Disk wurde mittels SCHIFFScher-Base-Methode funktionalisiert. Durch BDE als Comonomer reduzierte sich die Porengröße bei einer gleichbleibend hohen Porosität von 59 % auf 400 nm, wodurch sich die spezifische Ober-



fläche auf  $22 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$  verdreifachte. Außerdem zeigte der optimierte Monolith eine hohe Rigidität nach SHORE A von 61 im Vergleich zu der des GE-500-Monoliths von 39.

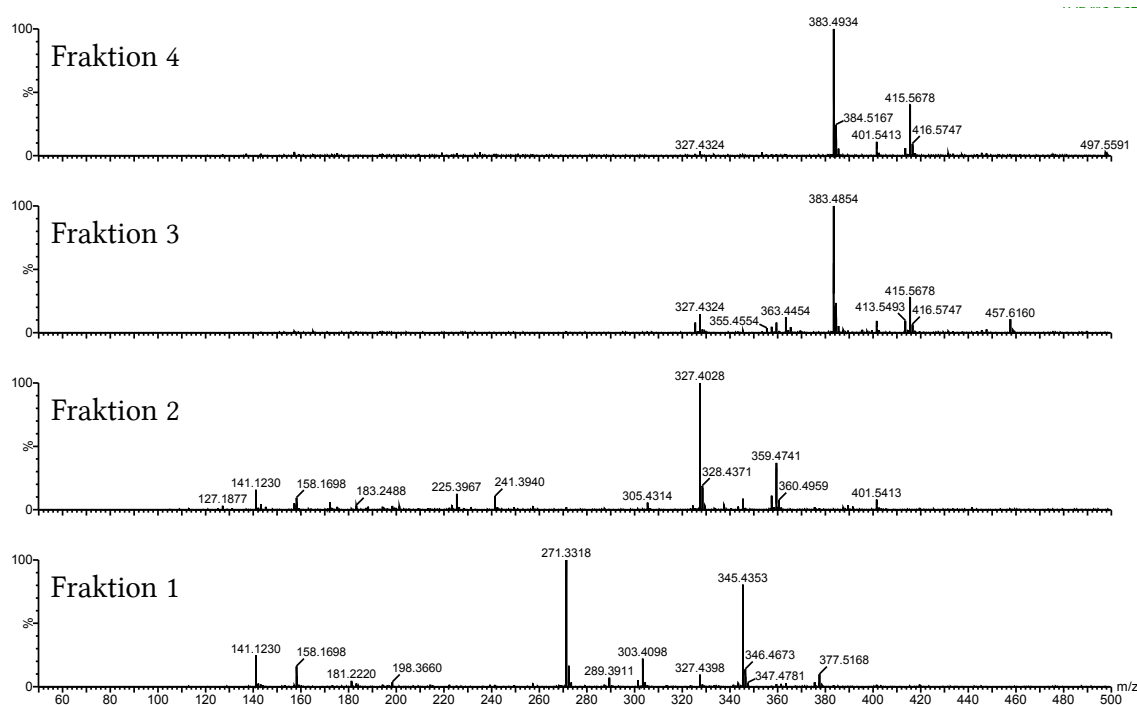
Die Kapazität war zwar im Vergleich zu der von GMA/EDMA-basierten CIM<sup>®</sup> r-Protein A Disks ( $\geq 10 \text{ mg ml}^{-1}$ ) von BIA Separations d.o.o. (Ajdovščina, Slovenien) relativ gering. Die erzielten Kapazitäten sind jedoch für analytische Anwendungen schon gut geeignet. Die durchgeführten Arbeiten zeigten, dass epoxidbasierte Monolithe durch die Autopolymerisation polyfunktioneller Glycidylether hergestellt wurden und als Träger in der Affinitätschromatographie einsetzbar sind.

Ein Vorteil gegenüber GMA/EDMA-Monolithen ist die Möglichkeit, die Polymerisation bei Raumtemperatur durchführen zu können. Dadurch ist in Zukunft ein erleichtertes Scale-up des Monolithformats möglich, sodass die Phasen zur Anreicherung aus großen Volumina mit hohem Durchsatz zur Anwendung kommen könnten. Bei einem Scale-up sind vor allem durch Temperaturgradienten entstehende Inhomogenitäten der Porenstruktur problematisch, die aber durch die Polymerisation bei Raumtemperatur voraussichtlich minimiert wären. Aufgrund ihrer Epoxidfunktionalität sind für die entwickelte Phase Derivatisierungsmöglichkeiten und vielfältige Anwendungen denkbar.

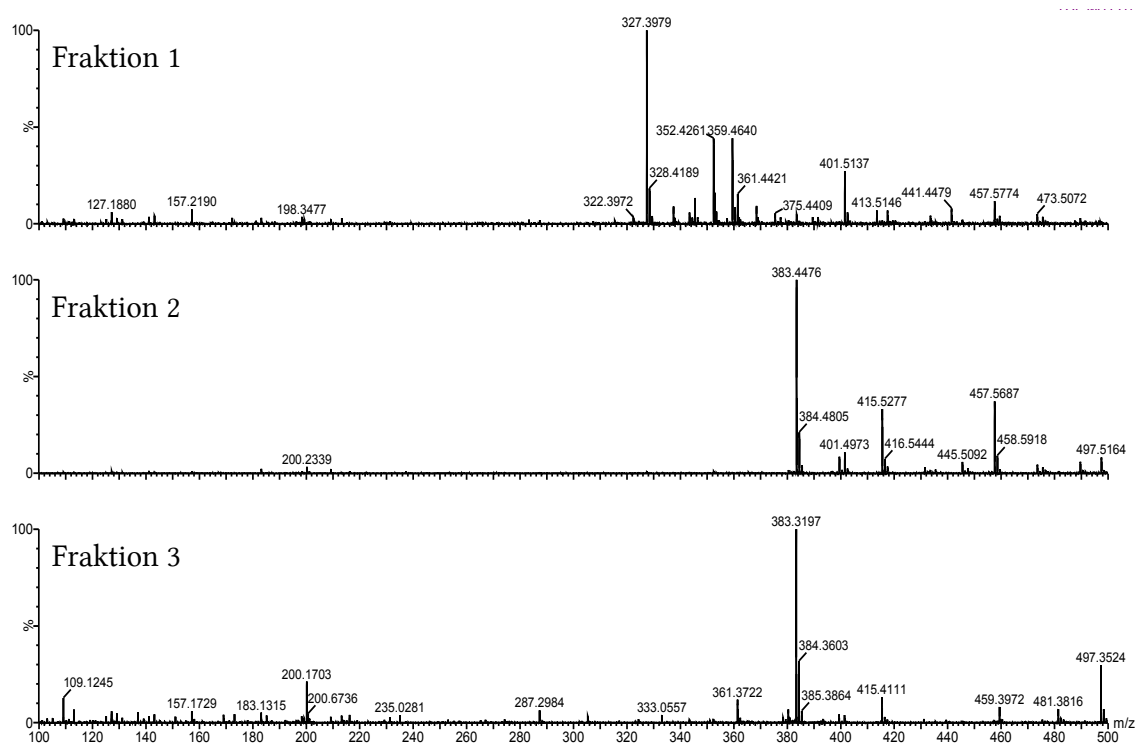


# Anhang

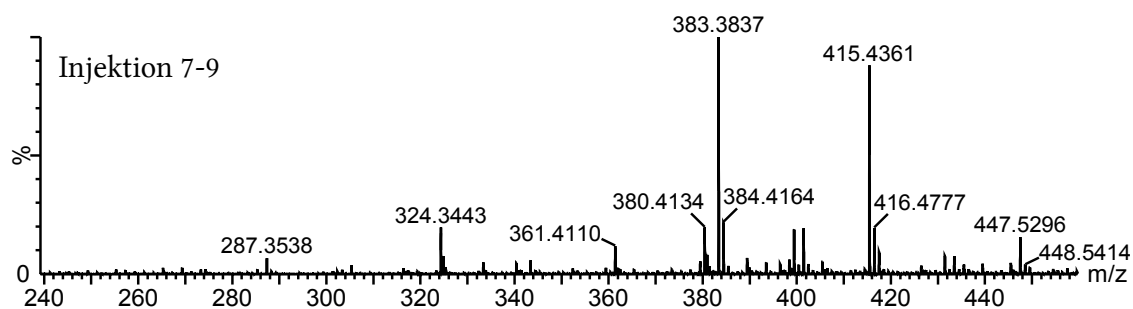
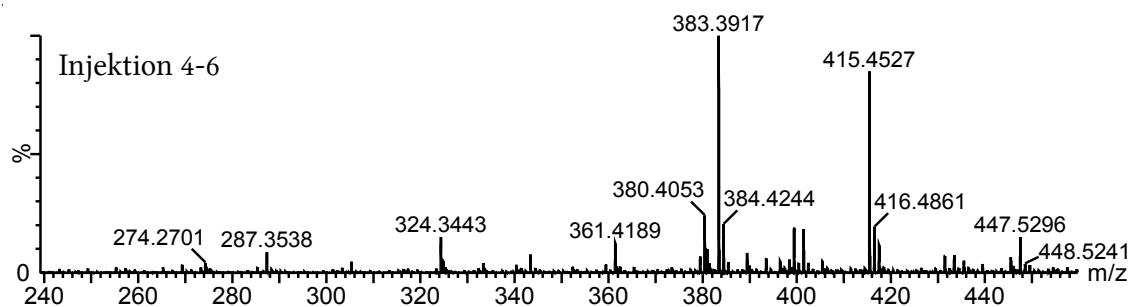
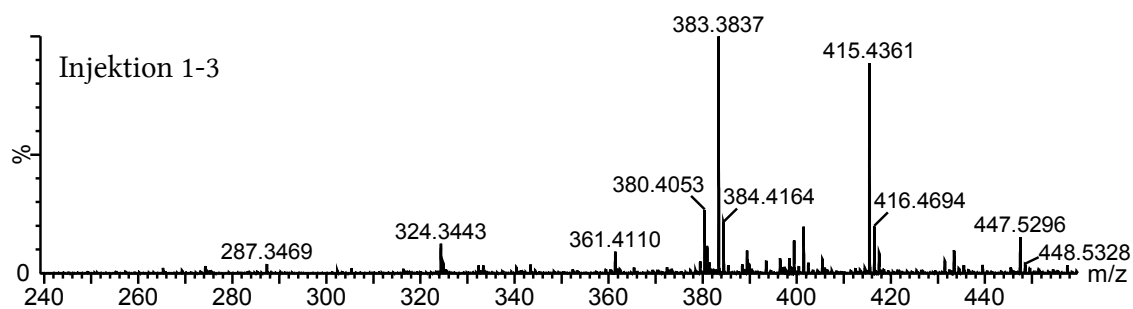
## A.1 Massenspektren

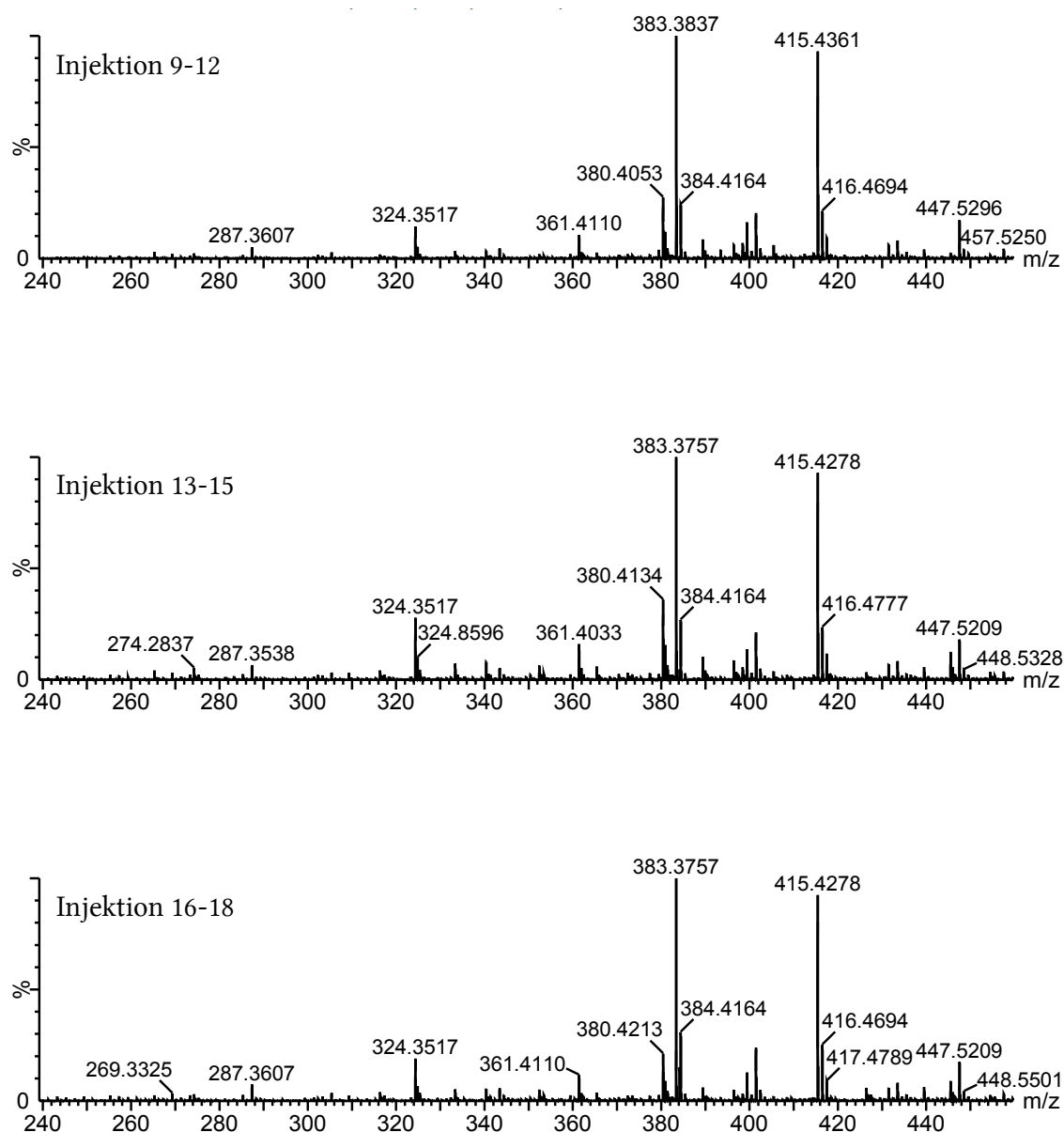


**Abbildung A.1.** Massenspektren (ESI+) der Fraktionen ((a)  $t_R = 2,54$  min, (b)  $t_R = 2,85$  min, (c)  $t_R = 3,26$  min, (d)  $t_R = 3,64$  min) von Ansatz 1 der Synthese von **1** ( $M = 360,4 \text{ g mol}^{-1}$ ) (vgl. Chromatogramm in Abbildung 4.2 auf Seite 84).

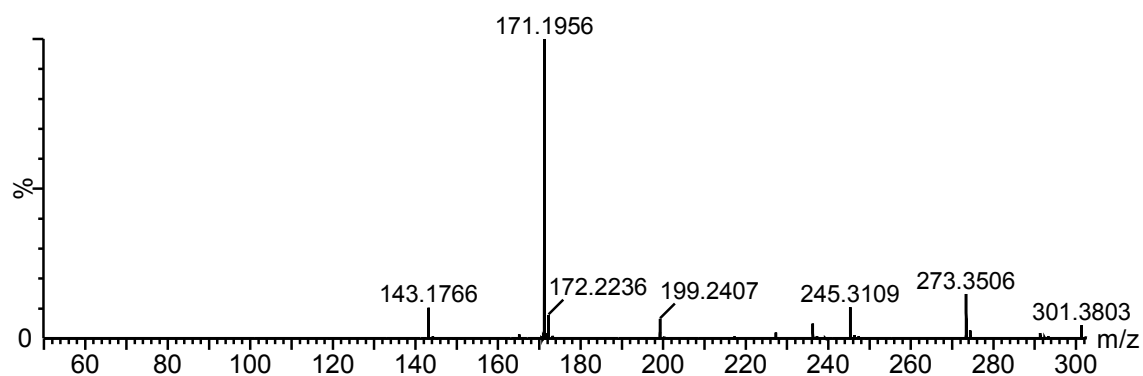


**Abbildung A.2.** Massenspektren (ESI+) der Fraktionen ((a)  $t_R = 3,12$  min, (b)  $t_R = 3,77$  min, (c)  $t_R = 4,42$  min) von Ansatz 2 der Synthese von **1** ( $M = 360,4 \text{ g mol}^{-1}$ ) (vgl. Chromatogramm in Abbildung 4.2 auf Seite 84).

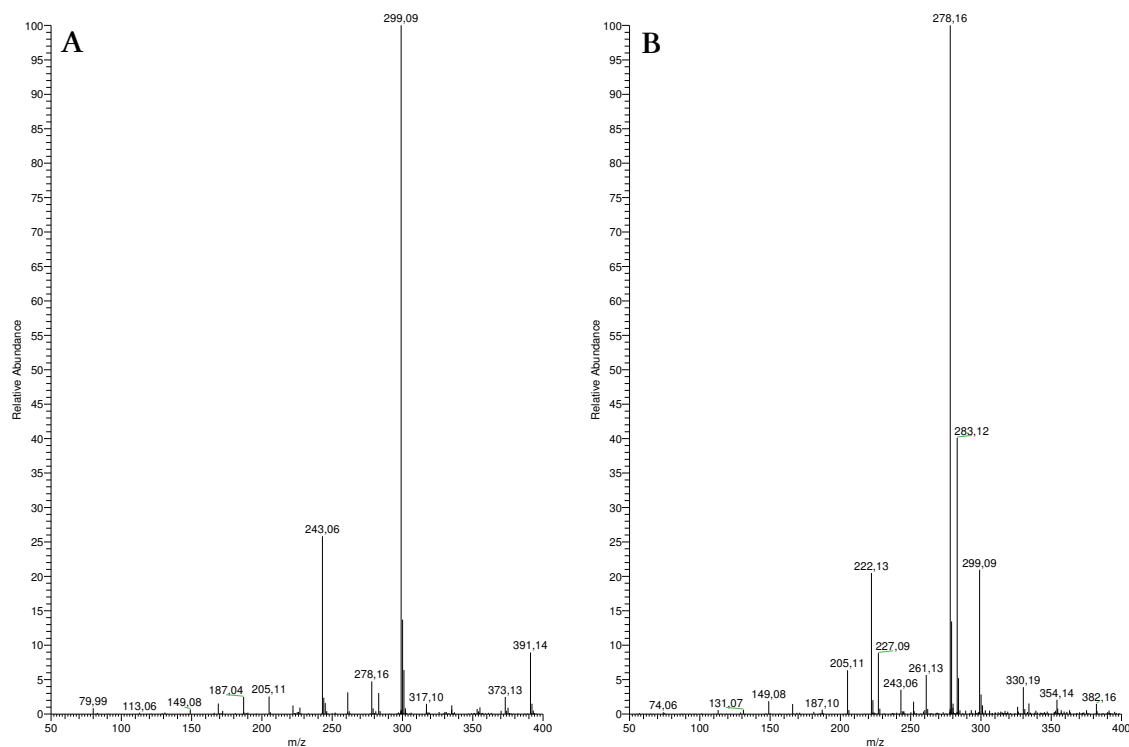




**Abbildung A.3.** Massenspektren (ESI+) der dritten Fraktion (c,  $t_R = 4,42$  min) von Ansatz 2 der Synthese von **1** ( $M = 360,4 \text{ g mol}^{-1}$ ) (vgl. Chromatogramm in Abbildung 4.2 auf Seite 84).

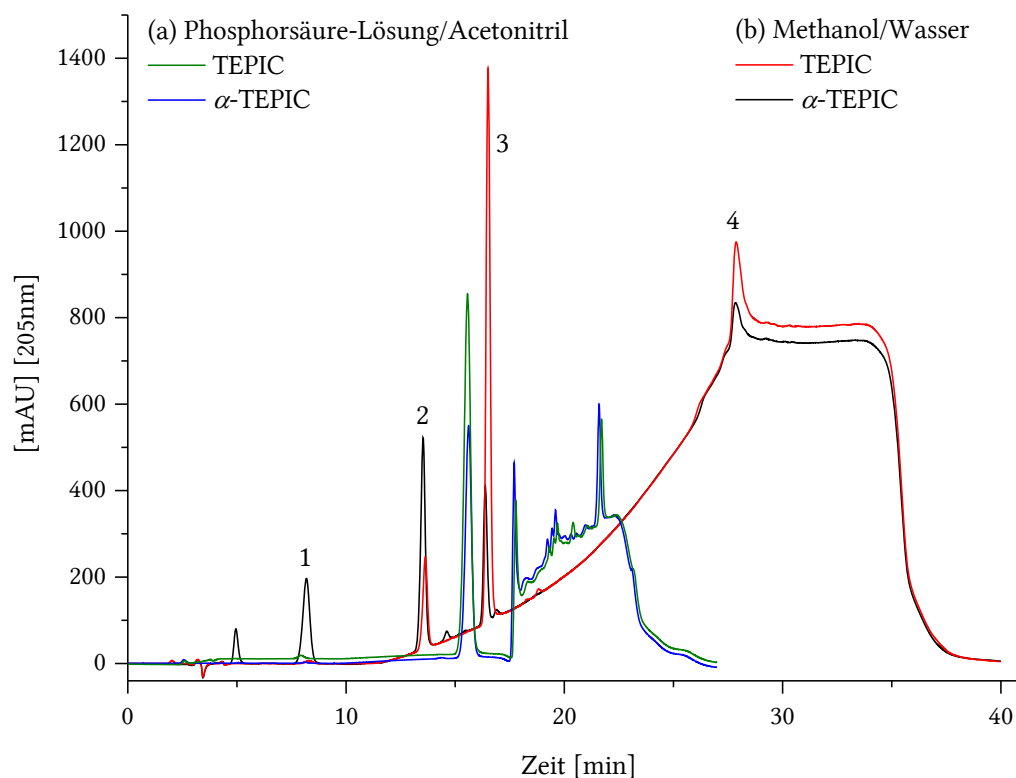


**Abbildung A.4.** Massenspektrum (ESI+) vom unaufgereinigten Ansatz 1 der Synthese von **5** ( $M = 260,3 \text{ g mol}^{-1}$ ).



**Abbildung A.5.** Massenspektren (ESI+) von Ansatz 2 der Synthese von **5** ( $M = 260,28 \text{ g mol}^{-1}$ ) vor (links) und nach (rechts) Destillation im Vakuum.

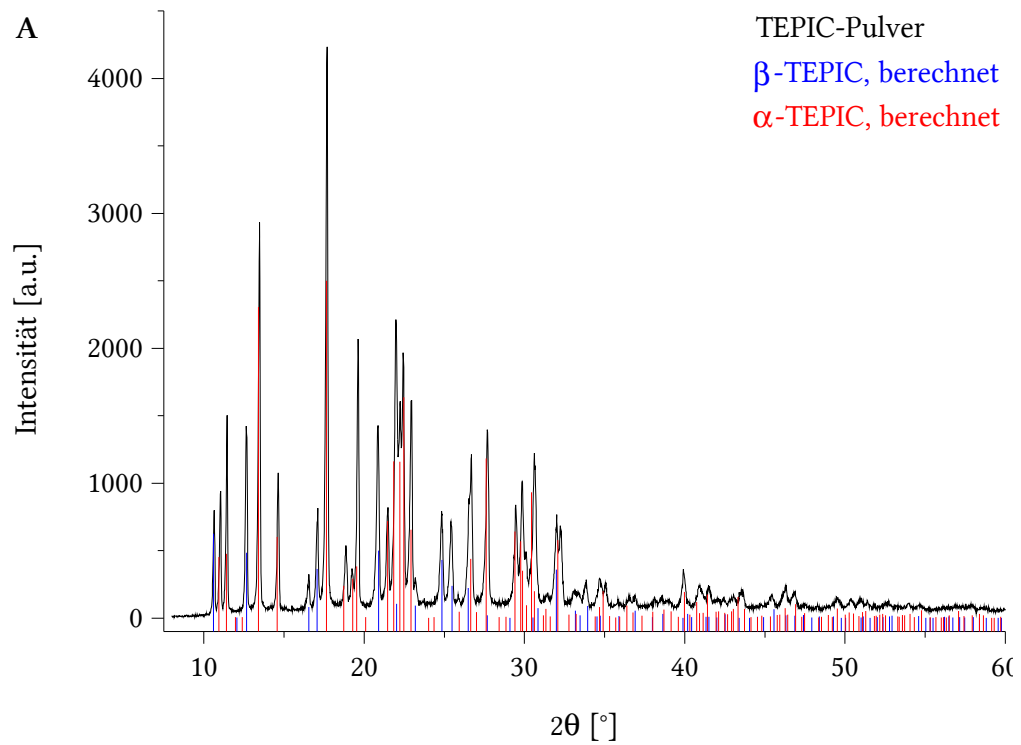
## A.2 Chromatogramme

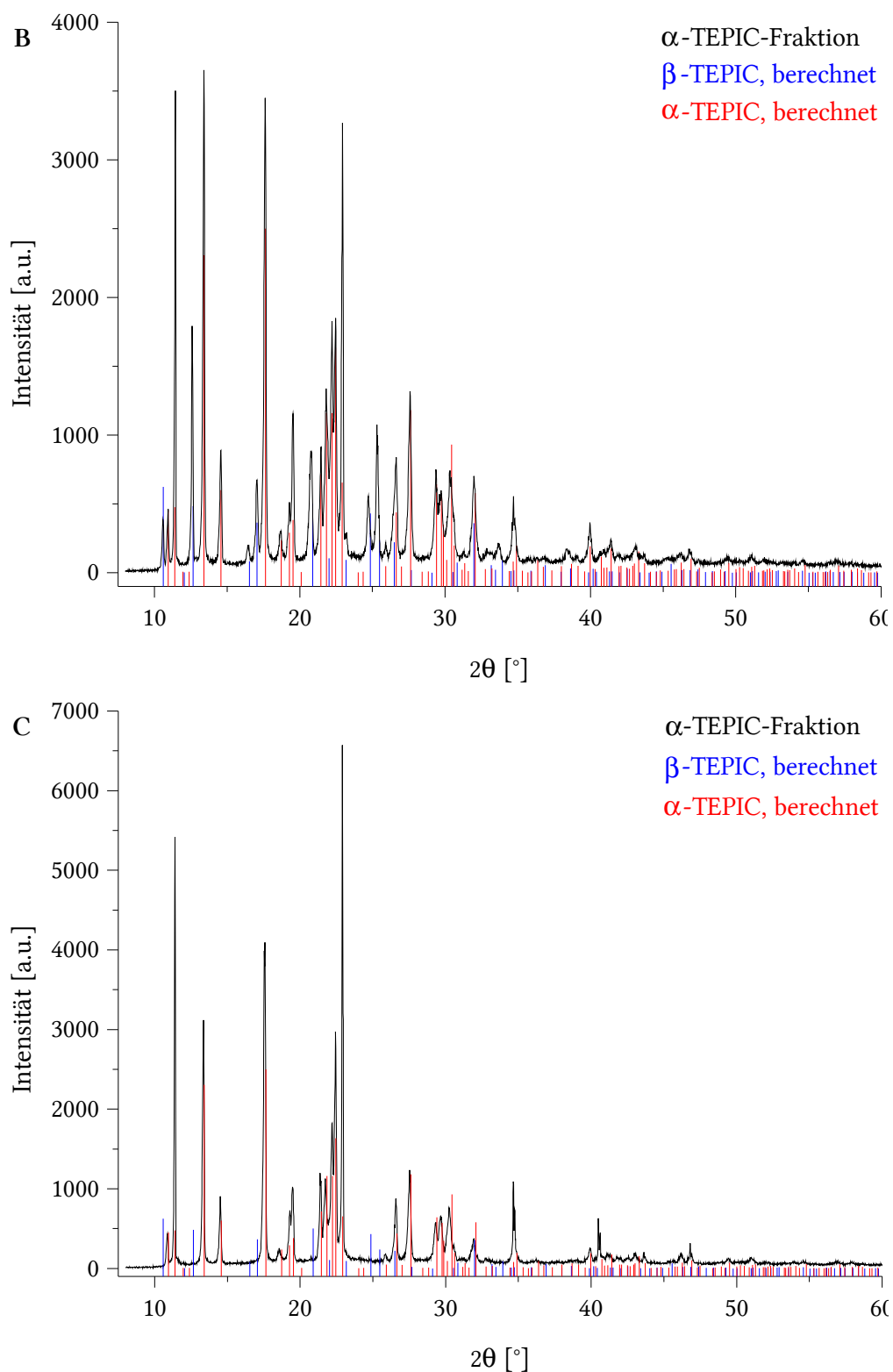


**Abbildung A.6.** Chromatogramme von kommerziell erworbenem Tris(2,3-epoxypropyl)isocyanurat (TEPIC) und  $\alpha$ -Tris(2,3-epoxypropyl)isocyanurat ( $\alpha$ -TEPIC), Chromatographische Bedingungen: Säule Inertsil ODS-3 (5  $\mu$ m, 4,6  $\times$  250 mm), Flussrate 0,2 mL min<sup>-1</sup>, Injektionsvolumen 25  $\mu$ L,  $\lambda$  = 205 nm, Gradienten (a) 10 min Eluent B, 5 min Eluent A, 12 min Eluent B, (b) 3 min 10 % Methanol, 10-90 % Methanol in 17 min, 7 min 90 % Methanol, 13 min 10 % Methanol. Es sind die Signale markiert, deren Elutionsvolumina fraktioniert und massenspektrometrisch analysiert wurden.



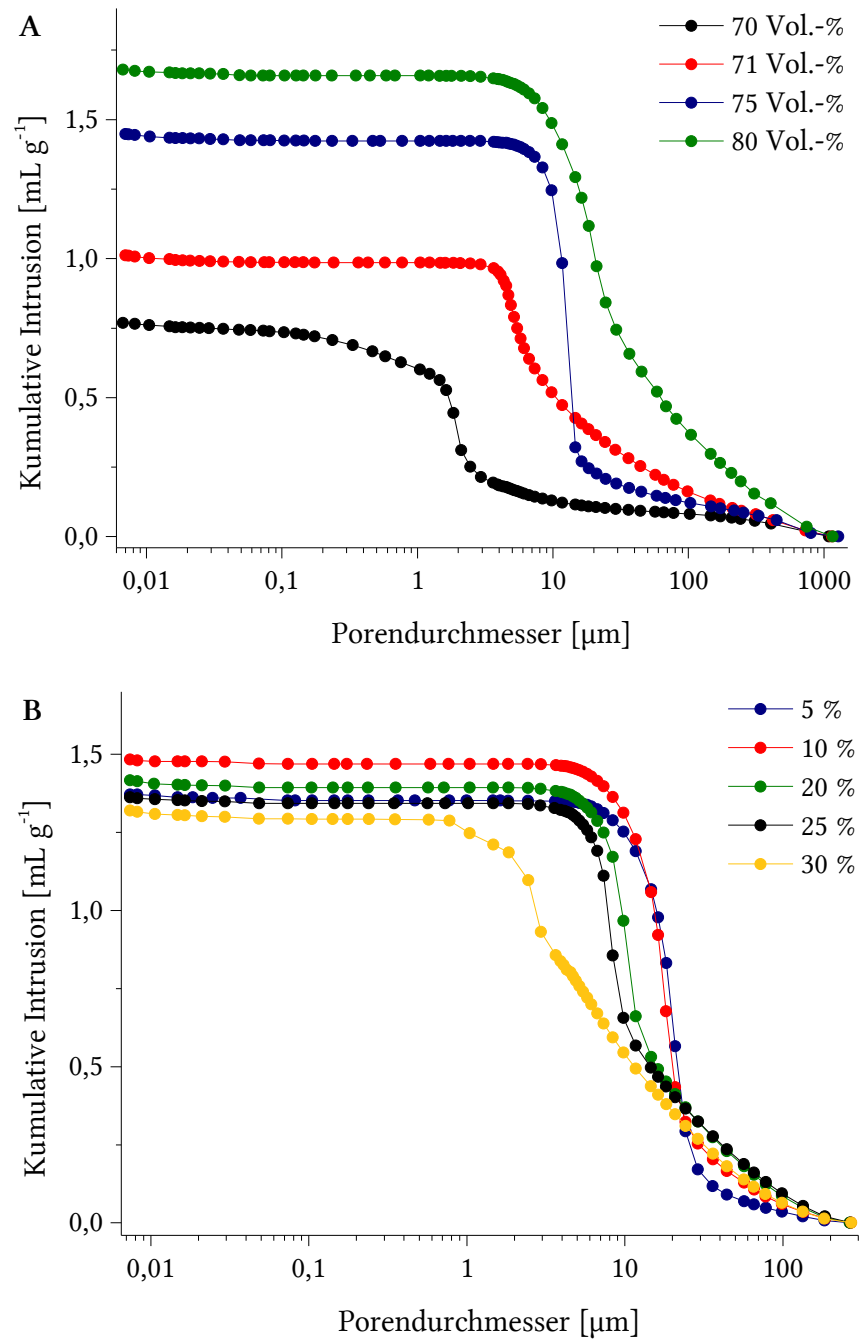
## A.3 Pulverdiffraktogramme

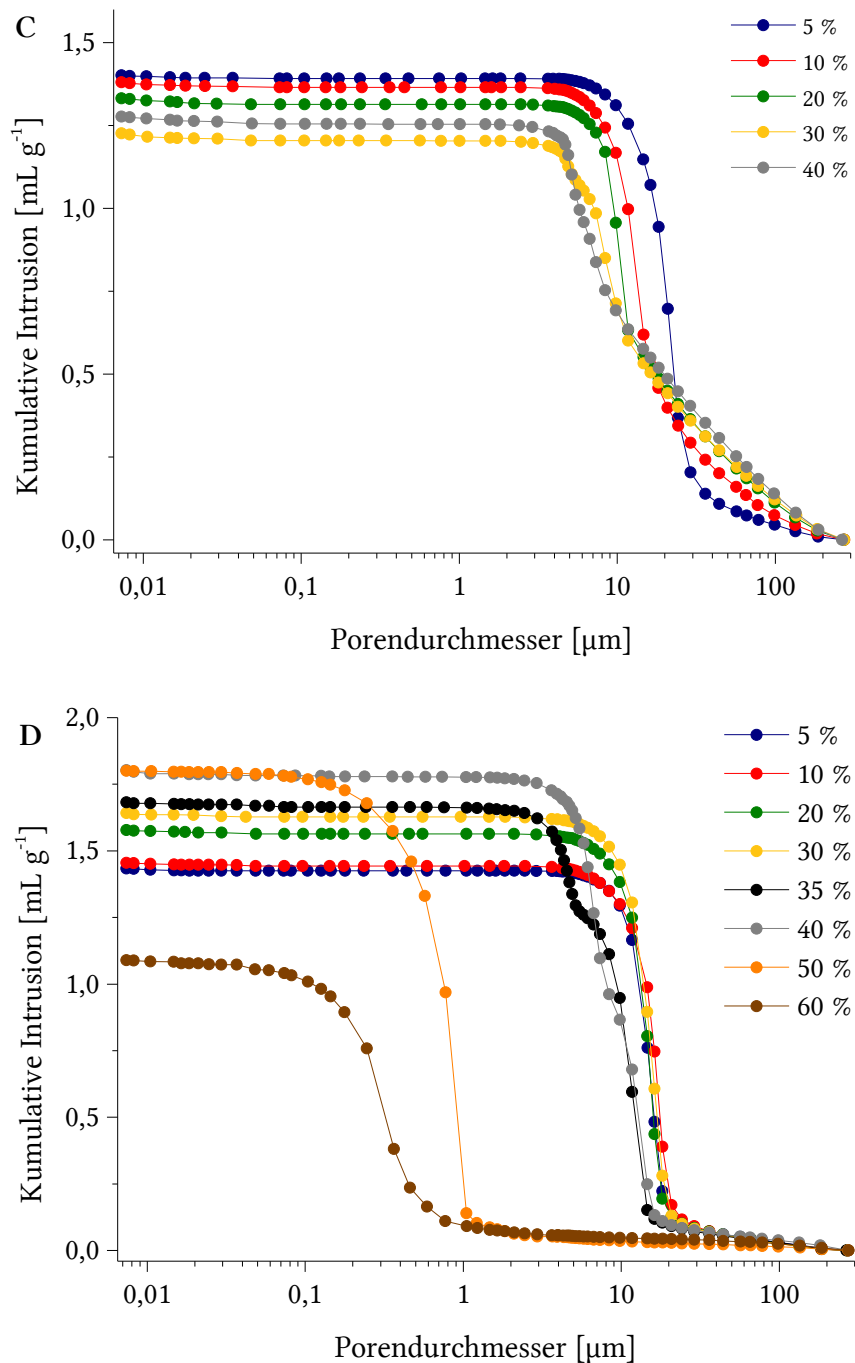




**Abbildung A.7.** Diffraktogramme von kommerziell erworbenem Tris(2,3-epoxypropyl)isocyanurat (TEPIC), (A) unaufgereinigt sowie (B) einfach und (C) vierfach aus Methanol umkristallisiert.

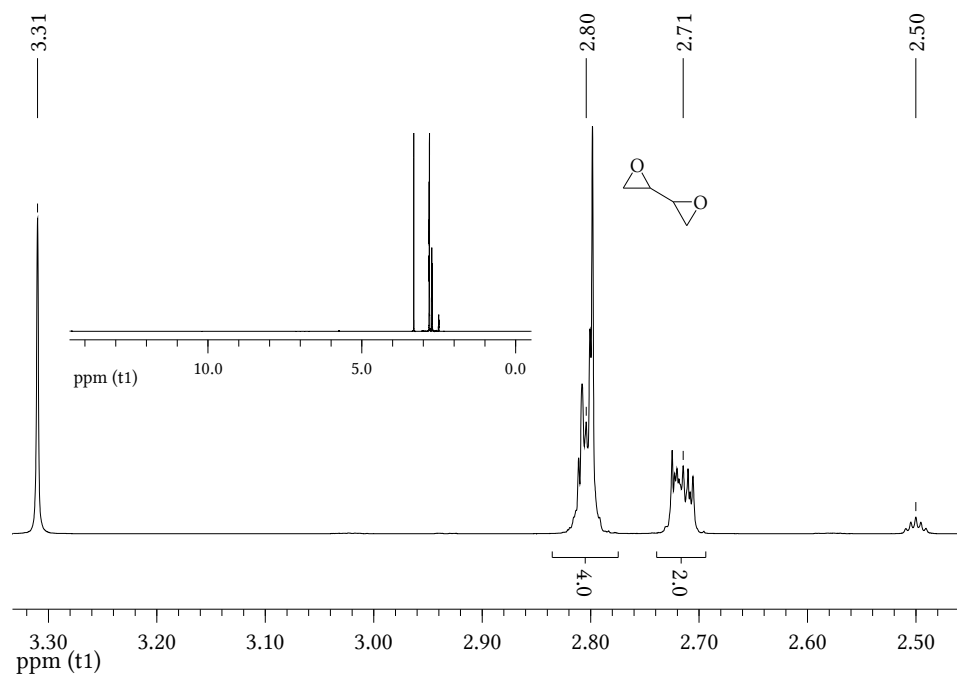
## A.4 Quecksilber-Intrusionskurven



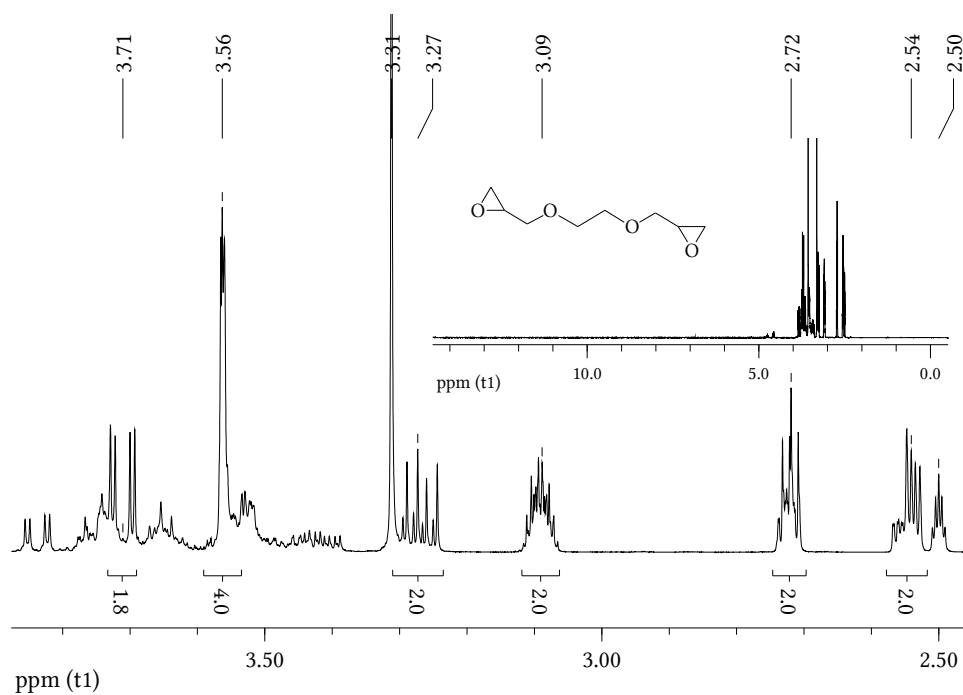


**Abbildung A.8.** Quecksilber-Intrusionskurven von Monolithen, hergestellt mit (A) **GE 500** als Monomer und 1,25 Vol.-% Bortrifluoridetherat (1:10) als Katalysator in 1,4-Dioxan/Methyl-*tert*-butylether (MTBE) (3:2) als Porogen mit variierendem Volumenanteil, (0,005-200 MPa) sowie mit **GE 500** in Mischung mit (B) 1,4-Butandiol diglycidylether (**BDG**), (C) Ethylenglycoldiglycidylether (**EDG**) oder (D) 1,3-Butadiendiepoxid (**BDE**) als Comonomer mit variierendem Anteil an 25 Vol.-% Gesamtmonomeranteil in 75 Vol.-% Porogen (1,4-Dioxan/Methyl-*tert*-butylether (MTBE) (3:2)) und 1,25 Vol.-% Bortrifluoridetherat (1:10) als Katalysator, (0,0007-200 MPa).

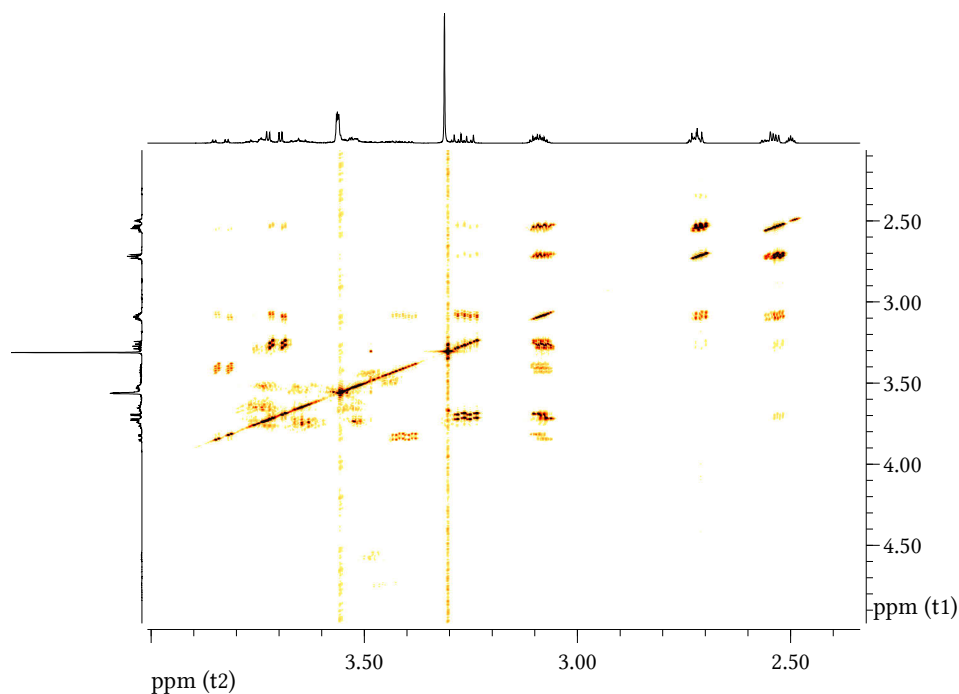
## A.5 Kernspinresonanzspektren (NMR)



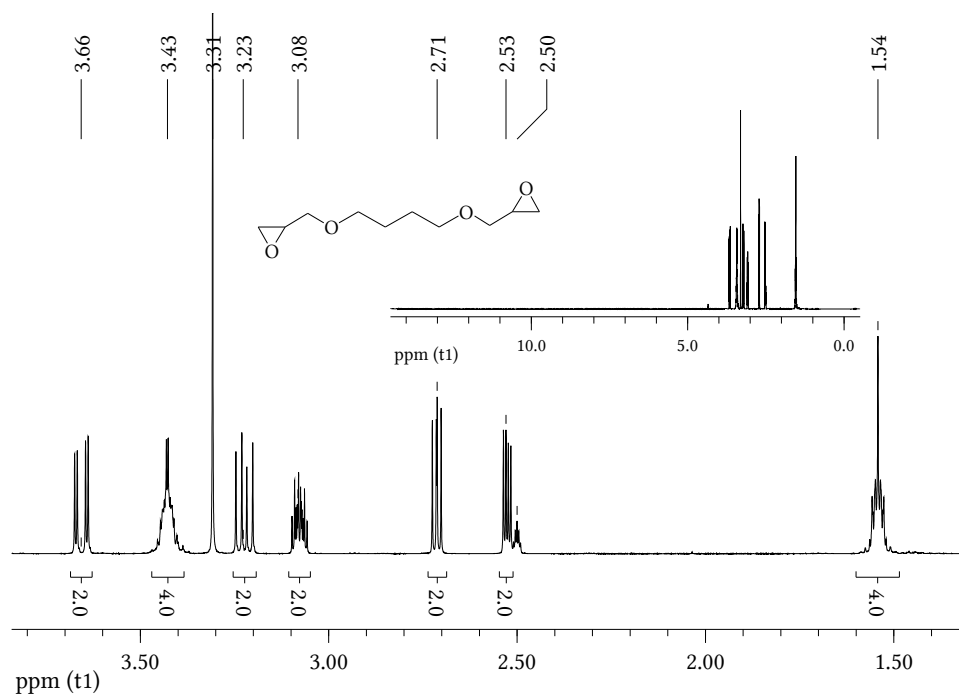
**Abbildung A.9.**  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum ( $\text{DMSO-d}_6$ , 400 MHz) von 1,3-Butadiendiepoxid (BDE,  $\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_2$ ).



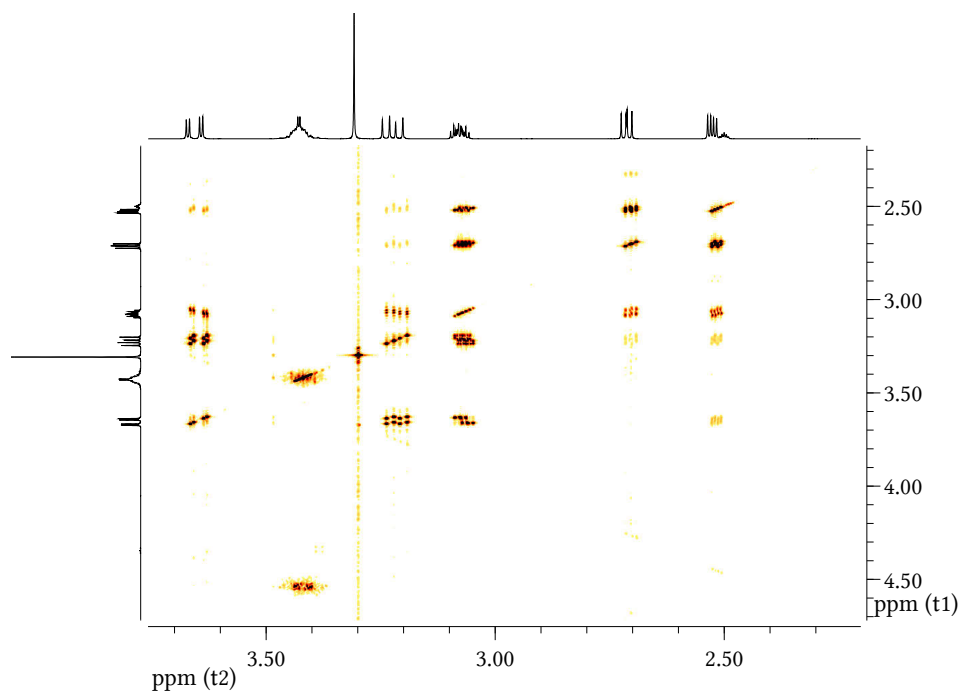
**Abbildung A.10.**  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum (DMSO- $d_6$ , 400 MHz) von Ethylenglycoldiglycidylether (EDG,  $\text{C}_8\text{H}_{14}\text{O}_4$ ).



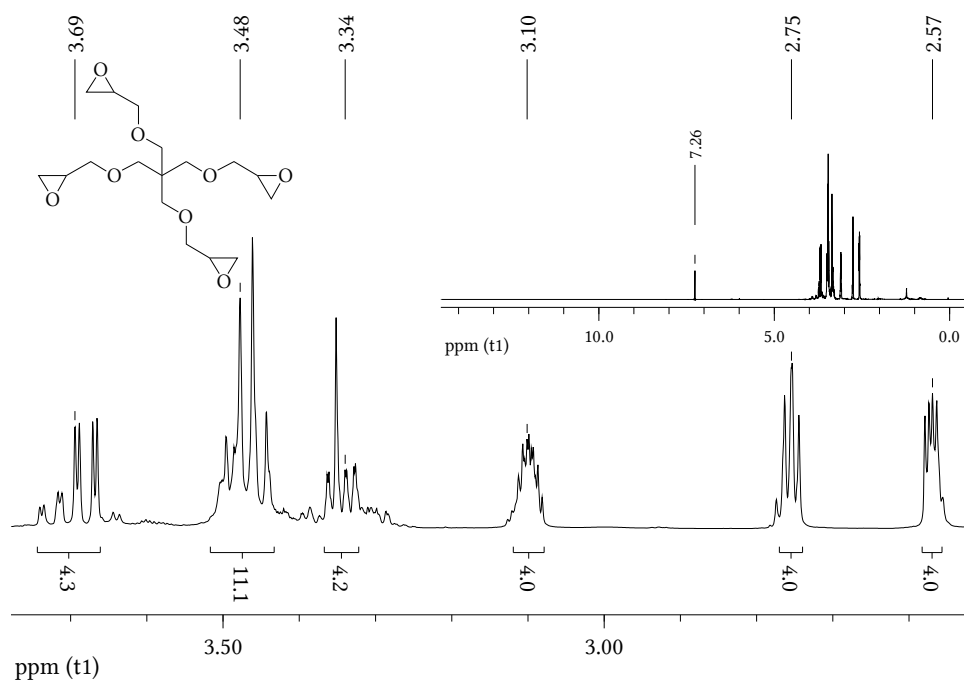
**Abbildung A.11.**  $\text{H,H}$ -COSY-Spektrum (DMSO- $d_6$ , 400 MHz) von Ethylenglycoldiglycidylether (EDG).



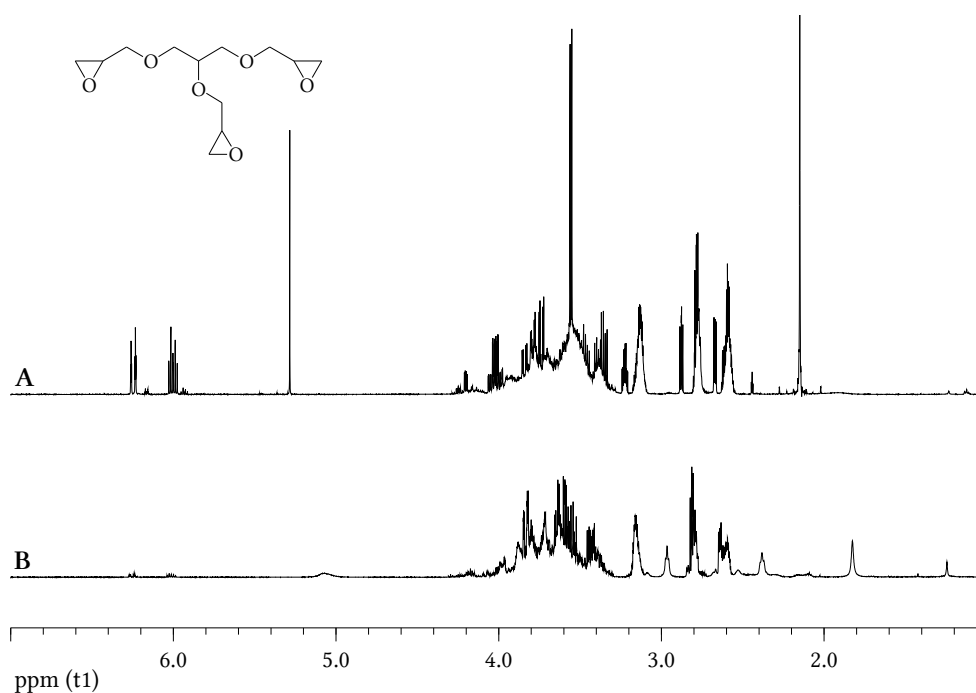
**Abbildung A.12.** <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz) von 1,4-Butandioldiglycidylether (BDG, C<sub>10</sub>H<sub>18</sub>O<sub>4</sub>).



**Abbildung A.13.** H,H-COSY-Spektrum (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz) von 1,4-Butandioldiglycidylether (BDG).

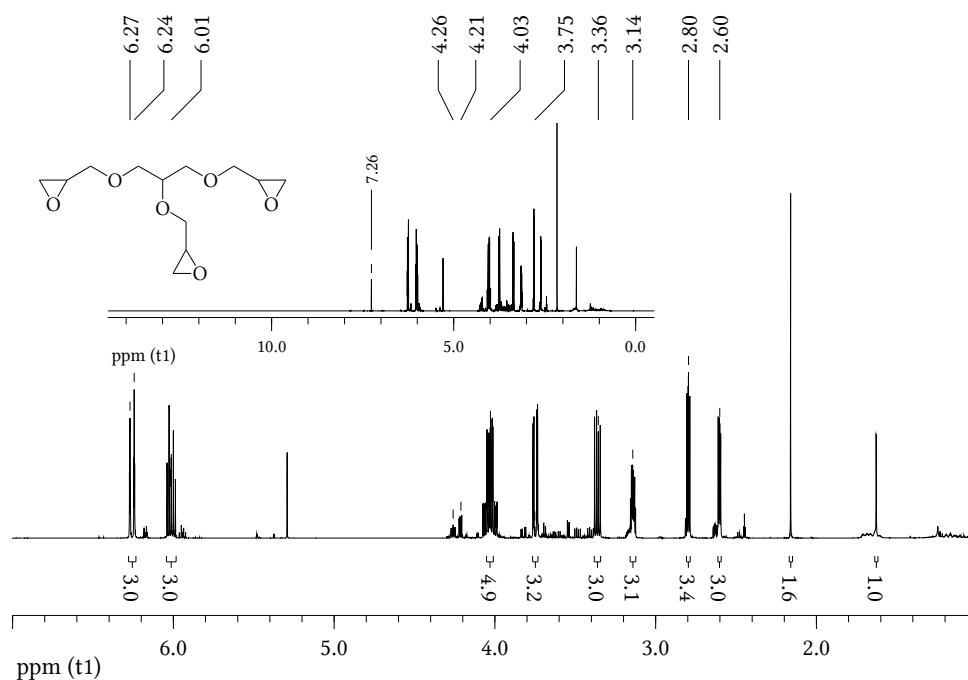


**Abbildung A.14.**  $^1\text{H}$ -Spektrum ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) der dritten Fraktion ( $c$ ,  $t_R = 4,42$  min) von Ansatz 2 (vgl. Chromatogramm in Abbildung 4.2 auf Seite 84) der Synthese von **1** ( $\text{C}_{17}\text{H}_{28}\text{O}_8$ ).

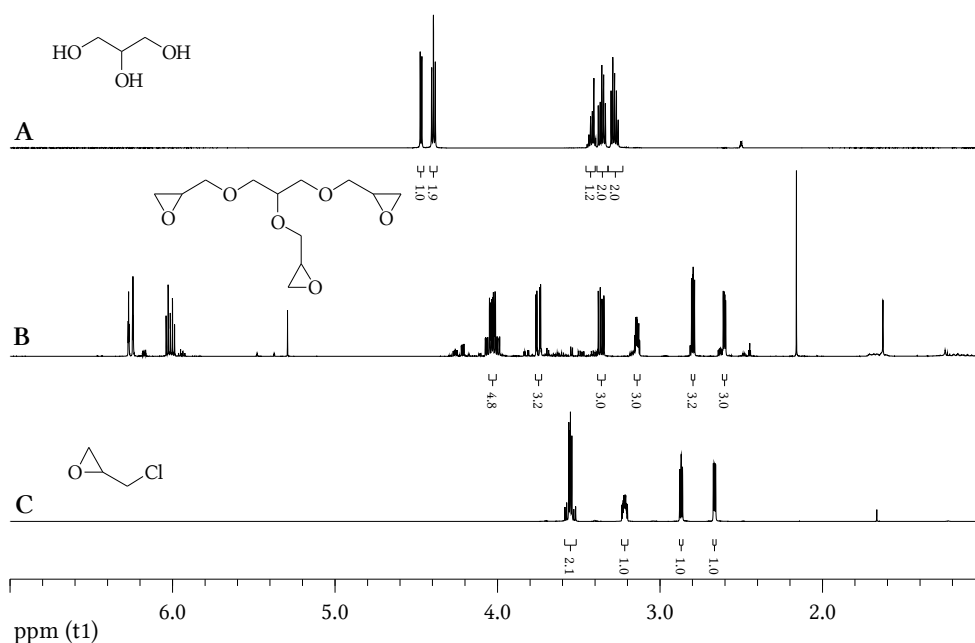


**Abbildung A.15.**  $^1\text{H}$ -Spektrum ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) von Ansatz 2 der Synthese von **5** ( $\text{C}_{12}\text{H}_{20}\text{O}_6$ ) (A) vor und (B) nach destillativer Aufreinigung im Vakuum.

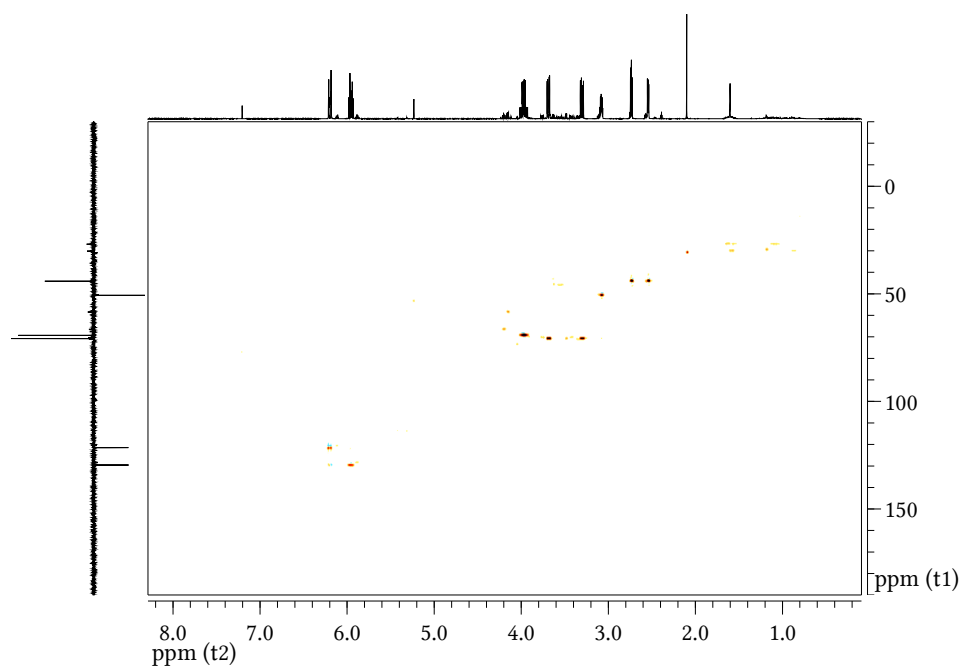




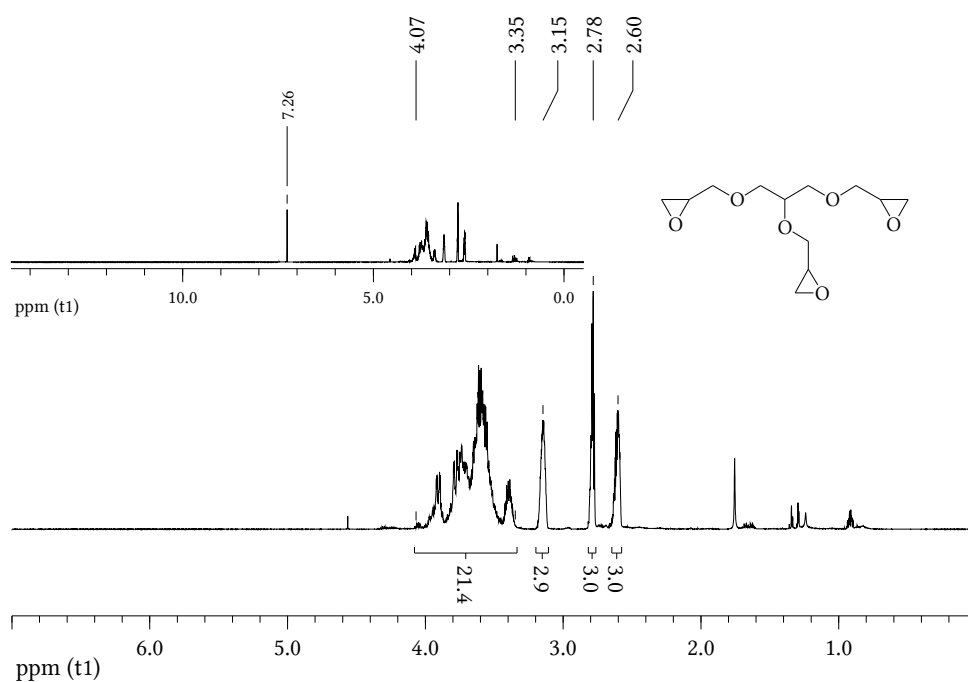
**Abbildung A.16.** <sup>1</sup>H-Spektrum (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) von Ansatz 3 der Synthese 5 (C<sub>12</sub>H<sub>20</sub>O<sub>6</sub>) nach säulenchromatographischer Aufreinigung.



**Abbildung A.17.** <sup>1</sup>H-Spektrum (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) von (A) Glycerol, (B) Ansatz 3 der Synthese von 5 nach säulenchromatographischer Aufreinigung und (C) Epichlorhydrin.



**Abbildung A.18.** C,H-COSY-Spektrum ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz und 126 MHz) von Ansatz 3 der Synthese von **5** nach säulenchromatographischer Aufreinigung.



**Abbildung A.19.**  $^1\text{H}$ -Spektrum ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) von **GE 100** ( $\text{C}_{12}\text{H}_{20}\text{O}_6$ ).

# Literaturverzeichnis

- [1] Švec F. Porous polymer monoliths: Amazingly wide variety of techniques enabling their preparation. *J Chromatogr A*. 2010;1217:902–924.
- [2] Minakuchi H, Nakanishi K, Soga N, Ishizuka N, Tanaka N. Octadecylsilylated porous silica rods as separation media for reversed-phase liquid chromatography. *Anal Chem*. 1996;68:3498–3501.
- [3] Guiochon G. Monolithic columns in high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A*. 2007;1168:101–168.
- [4] Talebi M, Arrua RD, Gaspar A, Lacher NA, Wang Q, Haddad PR, et al. Epoxy-based monoliths for capillary liquid chromatography of small and large molecules. *Anal Bioanal Chem*. 2013;405:2233–2244.
- [5] Petro M, Švec F, Gitsov I, Fréchet JMJ. Molded monolithic rod of macroporous poly(styrene-*co*-divinylbenzene) as a separation medium for HPLC of synthetic polymers: „On-column“ precipitation-redissolution chromatography as an alternative to size exclusion chromatography of styrene oligomers and polymers. *Anal Chem*. 1996;68:315–321.
- [6] Sýkora D, Švec F, Fréchet JMJ. Separation of oligonucleotides on novel monolithic columns with ion-exchange functional surfaces. *J Chromatogr A*. 1999;852:297–304.
- [7] Wang QC, Švec F, Fréchet JMJ. Macroporous polymeric stationary-phase rod as continuous separation medium for reversed-phase chromatography. *Anal Chem*. 1993;65:2243–2248.
- [8] Arrua RD, Talebi M, Causon TJ, Hilder EF. Review of recent advances in the preparation of organic polymer monoliths for liquid chromatography of large molecules. *Anal Chim Acta*. 2012;738:1–12.

- [9] Tennikova TB, Freitag R. An introduction to monolithic disks as stationary phases for high performance biochromatography. *J High Resolut Chromatogr.* 2000;23:27–38.
- [10] Tscheliessnig A, Jungbauer A. High-performance monolith affinity chromatography for fast quantitation of immunoglobulin G. *J Chromatogr A.* 2009;1216:2676–2682.
- [11] Weller M, Peskoller C, Niessner R. Synthetic resins based on epoxides. WO 2008/135246; 02. Mai 2007.
- [12] Ott S, Niessner R, Seidel M. Preparation of epoxy-based macroporous monolithic columns for the fast and efficient immunofiltration of *Staphylococcus aureus*. *J Sep Sci.* 2011;34:2181–2192.
- [13] Peskoller C, Niessner R, Seidel M. Development of an epoxy-based monolith used for the affinity capturing of *Escherichia coli* bacteria. *J Chromatogr A.* 2009;1216:3794–3801.
- [14] The Nobel Foundation. Synge, RLM; August 2013. Abgerufen unter: [http://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/chemistry/laureates/1952/synge-facts.html](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1952/synge-facts.html).
- [15] Švec F, Huber CG. Monolithic materials - Promises, challenges, achievements. *Anal Chem.* 2006;78:2100–2107.
- [16] Mould DL, Synge RLM. Separations of polysaccharides related to starch by electrokinetic ultrafiltration in collodion membranes. *Biochem J.* 1954;58:571–585.
- [17] Mould DL, Synge RLM. Electrokinetic ultrafiltration analysis of polysaccharides. A new approach to the chromatography of large molecules. *Analyst.* 1952;77:964–969.
- [18] Kubín M, Špaček P, Chromeček R. Gel permeation chromatography on porous poly(ethylene glycol methacrylate). *Collect Czech Chem Commun.* 1967;32:3881–3887.
- [19] Buchmeiser MR. Polymeric monolithic materials: Syntheses, properties, functionalization and applications. *Polymer.* 2007;48:2187–2198.
- [20] Schnecko H, Bieber O. Foam filled columns in gas chromatography. *Chromatographia.* 1971;4:109–112.

- [21] Hileman F, Sievers R, Hess G, Ross W. *In situ* preparation and evaluation of open pore polyurethane chromatographic columns. *Anal Chem.* 1973;45:1126–1130.
- [22] Ross WD, Jefferson RT. *In situ*-formed open-pore polyurethane as chromatography supports. *J Chromatogr Sci.* 1970;8:386–389.
- [23] Hansen LC, Sievers RE. Highly permeable open-pore polyurethane columns for liquid chromatography. *J Chromatogr A.* 1974;99:123–133.
- [24] Lynn TR, Rushneck DR, Cooper AR. High resolution low pressure liquid-chromatography. *J Chromatogr Sci.* 1974;12:76–79.
- [25] Trojer L, Greiderer A, Bisjak CP, Wieder W, Heigl N, Huck CW, et al. Monolithic stationary phases in HPLC. In: Corradini D, Phillips TM, Hrsg. *Monolithic stationary phases in HPLC*. 2. Ed. Boca Raton: CRC Press, Taylor & Francis Group; 2011. S. 4–5.
- [26] Belenkii BG, Podkladenko AM, Kurenbin OI, Mal'tsev VG, Nasledov DG, Trushin SA. Peculiarities of zone migration and band broadening in gradient reversed-phase high-performance liquid-chromatography of proteins with respect to membrane chromatography. *J Chromatogr.* 1993;645:1–15.
- [27] Mal'tsev VG, Nasledov DG, Trushin SA, Tennikova TB, Vinogradova LV, Volokitina LN, et al. High-performance liquid-chromatography of proteins on short capillary columns. *J High Resolut Chromatogr.* 1990;13:185–189.
- [28] Tennikova TB, Švec F, Belenkii BG. High-performance membrane chromatography. A novel method of protein separation. *J Liq Chromatogr.* 1990;13:63–70.
- [29] Švec F, Fréchet JMJ. Continuous rods of macroporous polymer as high-performance liquid-chromatography separation media. *Anal Chem.* 1992;64:820–822.
- [30] Švec F, Fréchet JMJ. Kinetic control of pore formation in macroporous polymers. Formation of „molded“ porous materials with high flow characteristics for separations or catalysis. *Chem Mater.* 1995;7:707–715.
- [31] Hjertén S, Liao JL, Zhang R. High-performance liquid chromatography on continuous polymer beds. *J Chromatogr A.* 1989;473:273–275.
- [32] Liao JL, Zhang R, Hjertén S. Continuous beds for standard and micro high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A.* 1991;586:21–26.

- [33] Hjertén S, Li YM, Liao JL, Mohammad J, Nakazato K, Pettersson G. Continuous beds: High-resolving, cost-effective chromatographic matrices. *Nature*. 1992;356:810–811.
- [34] Belenkii BG. Monolithic stationary phases: Yesterday, today, and tomorrow. *Russ J Bioorg Chem*. 2006;32:323–332.
- [35] Kłodzińska E, Moravcova D, Jandera P, Buszewski B. Monolithic continuous beds as a new generation of stationary phase for chromatographic and electro-driven separations. *J Chromatogr A*. 2006;1109:51–59.
- [36] Peters EC, Švec F, Fréchet JMJ. Rigid macroporous polymer monoliths. *Adv Mater*. 1999;11:1169–1181.
- [37] Štulík K, Pacáková V, Suchánková J, Coufal P. Monolithic organic polymeric columns for capillary liquid chromatography and electrochromatography. *J Chromatogr B*. 2006;841:79–87.
- [38] Švec F. Organic polymer monoliths as stationary phases for capillary HPLC. *J Sep Sci*. 2004;27:1419–1430.
- [39] Švec F, Fréchet JMJ. Molded rigid monolithic porous polymers: An inexpensive, efficient, and versatile alternative to beads for the design of materials for numerous applications. *Ind Eng Chem Res*. 1999;38:34–48.
- [40] Švec F, Peters EC, Sýkora D, Fréchet JMJ. Design of the monolithic polymers used in capillary electrochromatography columns. *J Chromatogr A*. 2000;887:3–29.
- [41] Fields SM. Silica xerogel as a continuous column support for high-performance liquid chromatography. *Anal Chem*. 1996;68:2709–2712.
- [42] Altmaier S, Cabrera K. Structure and performance of silica-based monolithic HPLC columns. *J Sep Sci*. 2008;31:2551–2559.
- [43] Siouffi AM. Silica gel-based monoliths prepared by the sol-gel method: Facts and figures. *J Chromatogr A*. 2003;1000:801–818.
- [44] Švec F, Fréchet JMJ. New designs of macroporous polymers and supports: From separation to biocatalysis. *Science*. 1996;273:205–211.
- [45] Eppert G. Allgemeine theoretische Grundlagen. In: *Flüssigchromatographie, HPLC - Theorie und Praxis*. 3. Ed. Wiesbaden: Vieweg; 1997. S. 5–50.

- 
- [46] Everett DH. Manual of symbols and terminology for physicochemical quantities and units, Appendix 2: Definitions, terminology and symbols in colloid and surface chemistry. *Pure Appl Chem.* 1972;31:577–638.
- [47] Watanabe F, Kubo T, Kaya K, Hosoya K. Novel separation medium spongy monolith for high throughput analyses. *J Chromatogr A.* 2009;1216:7402–7408.
- [48] Causon TJ, Shellie RA, Hilder EF. High temperature liquid chromatography with monolithic capillary columns and pure water eluent. *Analyst.* 2009;134:440–442.
- [49] Feng S, Yang N, Pennathur S, Goodison S, Lubman DM. Enrichment of glycoproteins using nanoscale chelating concanavalin A monolithic capillary chromatography. *Anal Chem.* 2009;81:3776–3783.
- [50] Li Y, Tolley HD, Lee ML. Monoliths from poly(ethylene glycol) diacrylate and dimethacrylate for capillary hydrophobic interaction chromatography of proteins. *J Chromatogr A.* 2010;1217:4934–4945.
- [51] Li Y, Gu B, Tolley HD, Lee ML. Preparation of polymeric monoliths by copolymerization of acrylate monomers with amine functionalities for anion-exchange capillary liquid chromatography of proteins. *J Chromatogr A.* 2009;1216:5525–5532.
- [52] Zhong H, El Rassi Z. Neutral polar methacrylate-based monoliths for normal phase nano-LC and CEC of polar species including *N*-glycans. *J Sep Sci.* 2009;32:10–20.
- [53] Kalashnikova I, Ivanova N, Tennikova T. Development of a strategy of influenza virus separation based on pseudoaffinity chromatography on short monolithic columns. *Anal Chem.* 2008;80:2188–2198.
- [54] Branović K, Lattner G, Barut M, Štrancar A, Josić D, Buchacher A. Very fast analysis of impurities in immunoglobulin concentrates using conjoint liquid chromatography on short monolithic disks. *J Immunol Methods.* 2002;271:47–58.
- [55] Deverell JA, Rodemann T, Smith JA, Canty AJ, Guijt RM. UV initiated formation of polymer monoliths in glass and polymer microreactors. *Sens Actuators, B.* 2011;155:388–396.
- [56] Sun X, Yang W, Pan T, Woolley AT. Affinity monolith-integrated poly(methyl methacrylate) microchips for on-line protein extraction and capillary electrophoresis. *Anal Chem.* 2008;80:5126–5130.

- [57] Okay O. Macroporous copolymer networks. *Prog Polym Sci.* 2000;25:711–779.
- [58] Švec F, Fréchet JMJ. Rigid macroporous organic polymer monoliths prepared by free radical polymerization. In: Švec F, Tennikova TB, Deyl Z, Hrsg. *Monolithic Materials*. Amsterdam: Elsevier Science; 2003. S. 19–50.
- [59] Beneš MJ, Horák D, Švec F. Methacrylate-based chromatographic media. *J Sep Sci.* 2005;28:1855–1875.
- [60] Guyot A, Bartholin M. Design and properties of polymers as materials for fine chemistry. *Prog Polym Sci.* 1982;8:277–331.
- [61] Guyot A. Synthesis and structure of polymer supports. In: Sherrington DC, Hodge P, Hrsg. *Synthesis and separations using functional polymers*. Chichester: Wiley; 1988. S. 1–42.
- [62] Seidl J, Malinský J, Dušek K, Heitz W. Die Entstehung makroporöser Strukturen bei der vernetzenden Polymerisation. *Adv Polym Sci.* 1967;5:116–120.
- [63] Švec F, Fréchet JMJ. Temperature, a simple and efficient tool for the control of pore size distribution in macroporous polymers. *Macromolecules.* 1995;28:7580–7582.
- [64] Brooks BW. Basic aspects and recent developments in suspension polymerisation. *Makromol Chem, Macromol Symp.* 1990;35-36:121–140.
- [65] Yuan HG, Kalfas G, Ray WH. Suspension polymerization. *Macromol Chem Phys.* 1991;C31:215–299.
- [66] Viklund C, Švec F, Fréchet JMJ, Irgum K. Monolithic, „molded“, porous materials with high flow characteristics for separations, catalysis, or solid-phase chemistry: Control of porous properties during polymerization. *Chem Mater.* 1996;8:744–750.
- [67] Švec F, Fréchet JMJ. Molded separation media: An inexpensive, efficient, and versatile alternative to packed columns for the fast HPLC separation of peptides, proteins and synthetic oligomers and polymers. *Macromol Symp.* 1996;110:203–216.
- [68] Horák D, Švec F, Ilavský M, Bleha M, Baldrián J, Kálal J. Reactive polymers, 36. The effect of polymerization conditions on the porosity and mechanical properties of macroporous suspension copolymers from glycidylmethacrylate-ethylenedimethacrylate. *Angew Makromol Chem.* 1981;95:117–127.



- [69] Aoki H, Kubo T, Ikegami T, Tanaka N, Hosoya K, Tokuda D, et al. Preparation of glycerol dimethacrylate-based polymer monolith with unusual porous properties achieved via viscoelastic phase separation induced by monodisperse ultra high molecular weight poly(styrene) as a porogen. *J Chromatogr A*. 2006;1119:66–79.
- [70] Steinke JHG, Dunkin IR, Sherrington DC. Transparent macroporous polymer monoliths. *Macromolecules*. 1996;29:5826–5834.
- [71] Santora BP, Gagné MR, Moloy KG, Radu NS. Porogen and cross-linking effects on the surface area, pore volume distribution, and morphology of macroporous polymers obtained by bulk polymerization. *Macromolecules*. 2001;34:658–661.
- [72] Sederel WL, de Jong GJ. Styrene-divinylbenzene copolymers. Construction of porosity in styrene divinylbenzene matrices. *J Appl Polym Sci*. 1973;17:2835–2846.
- [73] Okay O, Gürün Ç. Synthesis and formation mechanism of porous 2-hydroxyethyl methacrylate-ethylene glycol dimethacrylate copolymer beads. *J Appl Polym Sci*. 1992;46:401–410.
- [74] Rosenberg JE, Flodin P. Macroporous gels. 2. Polymerization of trimethylolpropane trimethacrylate in various solvents. *Macromolecules*. 1987;20:1518–1522.
- [75] Kun KA, Kunin R. Macroreticular resins. 3. Formation of macroreticular styrene-divinylbenzene copolymers. *J Polym Sci, Part A-1: Polym Chem*. 1968;6:2689–2701.
- [76] Vlakh EG, Tennikova TB. Preparation of methacrylate monoliths. *J Sep Sci*. 2007;30:2801–2813.
- [77] Urban J, Jandera P. Polymethacrylate monolithic columns for capillary liquid chromatography. *J Sep Sci*. 2008;31:2521–2540.
- [78] Rabelo D, Coutinho FMB. Porous structure formation and swelling properties of styrene-divinylbenzene copolymers. *Eur Polym J*. 1994;30:675–682.
- [79] Grafnetter J, Coufal P, Tesařová E, Suchánková J, Bosáková Z, Ševčík J. Optimization of binary porogen solvent composition for preparation of butyl methacrylate monoliths in capillary liquid chromatography. *J Chromatogr A*. 2004;1049:43–49.
- [80] Moravcová D, Jandera P, Urban J, Planeta J. Characterization of polymer monolithic stationary phases for capillary HPLC. *J Sep Sci*. 2003;26:1005–1016.

- [81] Zalusky AS, Olayo-Valles R, Taylor CJ, Hillmyer MA. Mesoporous polystyrene monoliths. *J Am Chem Soc.* 2001;123:1519–1520.
- [82] Peters EC, Petro M, Švec F, Fréchet JMJ. Molded rigid polymer monoliths as separation media for capillary electrochromatography. 2. Effect of chromatographic conditions on the separation. *Anal Chem.* 1998;70:2296–2302.
- [83] Peters EC, Petro M, Švec F, Fréchet JMJ. Molded rigid polymer monoliths as separation media for capillary electrochromatography. 1. Fine control of porous properties and surface chemistry. *Anal Chem.* 1998;70:2288–2295.
- [84] Zhang L, Ping G, Zhang L, Zhang W, Zhang Y. Preparation and characterization of monolithic columns for capillary electrochromatography with weak electroosmotic flow. *J Sep Sci.* 2003;26:331–336.
- [85] Peters EC, Petro M, Švec F, Fréchet JMJ. Molded rigid polymer monoliths as separation media for capillary electrochromatography. *Anal Chem.* 1997;69:3646–3649.
- [86] Wang QC, Hosoya K, Švec F, Fréchet JMJ. Polymeric porogens used in the preparation of novel monodispersed macroporous polymeric separation media for high-performance liquid chromatography. *Anal Chem.* 1992;64:1232–1238.
- [87] Courtois J, Byström E, Irgum K. Novel monolithic materials using poly(ethylene glycol) as porogen for protein separation. *Polymer.* 2006;47:2603–2611.
- [88] Hebb AK, Senoo K, Cooper AI. Synthesis of porous cross-linked polymer monoliths using 1,1,1,2-tetrafluoroethane (R134a) as the porogen. *Compos Sci Technol.* 2003;63:2379–2387.
- [89] Hebb AK, Senoo K, Bhat R, Cooper AI. Structural control in porous cross-linked poly(methacrylate) monoliths using supercritical carbon dioxide as a „pressure-adjustable“ porogenic solvent. *Chem Mater.* 2003;15:2061–2069.
- [90] Cooper AI, Holmes AB. Synthesis of molded monolithic porous polymers using supercritical carbon dioxide as the porogenic solvent. *Adv Mater.* 1999;11:1270–1274.
- [91] Švec F, Fréchet JMJ. New formats of polymeric stationary phases for HPLC separations: Molded macroporous disks and rods. *J Mol Recognit.* 1996;9:326–334.

- 
- [92] Mihelič I, Koloini T, Podgornik A. Temperature distribution effects during polymerization of methacrylate-based monoliths. *J Appl Polym Sci.* 2003;87:2326–2334.
- [93] Koku H, Maier RS, Czymmek KJ, Schure MR, Lenhoff AM. Modeling of flow in a polymeric chromatographic monolith. *J Chromatogr A.* 2011;1218:3466–3475.
- [94] Nakanishi K, Soga N. Phase separation in silica sol-gel system containing polyacrylic acid 2. Effects of molecular weight and temperature. *J Non-Cryst Solids.* 1992;139:14–24.
- [95] Nakanishi K, Soga N. Phase separation in silica sol-gel system containing polyacrylic acid 1. Gel formation behavior and effect of solvent composition. *J Non-Cryst Solids.* 1992;139:1–13.
- [96] Nakanishi K, Soga N. Phase separation in gelling silica-organic polymer solution: Systems containing poly(sodium styrenesulfonate). *J Am Ceram Soc.* 1991;74:2518–2530.
- [97] Unger KK, Skudas R, Schulte MM. Particle packed columns and monolithic columns in high-performance liquid chromatography-comparison and critical appraisal. *J Chromatogr A.* 2008;1184:393–415.
- [98] Tanaka N, Kobayashi H, Ishizuka N, Minakuchi H, Nakanishi K, Hosoya K, et al. Monolithic silica columns for high-efficiency chromatographic separations. *J Chromatogr A.* 2002;965:35–49.
- [99] Kato M, Inuzuka K, Sakai-Kato K, Toyo'oka T. Monolithic bioreactor immobilizing trypsin for high-throughput analysis. *Anal Chem.* 2005;77:1813–1818.
- [100] Végvári A. Homogeneous gels for capillary electrochromatography. *J Chromatogr A.* 2005;1079:50–58.
- [101] Nakanishi K, Minakuchi H, Soga N, Tanaka N. Structure design of double-pore silica and its application to HPLC. *J Sol-Gel Sci Technol.* 1998;13:163–169.
- [102] Schiel JE, Mallik R, Soman S, Joseph KS, Hage DS. Applications of silica supports in affinity chromatography. *J Sep Sci.* 2006;29:719–737.
- [103] Cabrera K. Applications of silica-based monolithic HPLC columns. *J Sep Sci.* 2004;27:843–852.
- [104] Hoth DC, Rivera JG, Colón LA. Metal oxide monolithic columns. *J Chromatogr A.* 2005;1079:392–396.

- [105] Taguchi A, Smått JH, Lindén M. Carbon monoliths possessing a hierarchical, fully interconnected porosity. *Adv Mater.* 2003;15:1209–1211.
- [106] Liang C, Dai S, Guiochon G. A graphitized-carbon monolithic column. *Anal Chem.* 2003;75:4904–4912.
- [107] Premstaller A, Oberacher H, Walcher W, Timperio AM, Zolla L, Chervet JP, et al. High-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry using monolithic capillary columns for proteomic studies. *Anal Chem.* 2001;73:2390–2396.
- [108] Walcher W, Oberacher H, Troiani S, Hölzl G, Oefner P, Zolla L, et al. Monolithic capillary columns for liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry in proteomic and genomic research. *J Chromatogr B.* 2002;782:111–125.
- [109] Walcher W, Toll H, Ingendoh A, Huber CG. Operational variables in high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry of peptides and proteins using poly(styrene-divinylbenzene) monoliths. *J Chromatogr A.* 2004;1053:107–117.
- [110] Petro M, Švec F, Fréchet JMJ. Molded continuous poly(styrene-*co*-divinylbenzene) rod as a separation medium for the very fast separation of polymers - Comparison of the chromatographic properties of the monolithic rod with columns packed with porous and non-porous beads in high-performance liquid chromatography of polystyrenes. *J Chromatogr A.* 1996;752:59–66.
- [111] Wang QC, Švec F, Fréchet JMJ. Reversed-phase chromatography of small molecules and peptides on a continuous rod of macroporous poly (styrene-*co*-divinylbenzene). *J Chromatogr A.* 1994;669:230–235.
- [112] Švec F. Preparation and HPLC applications of rigid macroporous organic polymer monoliths. *J Sep Sci.* 2004;27:747–766.
- [113] Podgornik A, Barut M, Štrancar A, Josić D, Koloini T. Construction of large-volume monolithic columns. *Anal Chem.* 2000;72:5693–5699.
- [114] Barut M, Podgornik A, Brne P, Štrancar A. Convective Interaction Media short monolithic columns: Enabling chromatographic supports for the separation and purification of large biomolecules. *J Sep Sci.* 2005;28:1876–1892.
- [115] Benčina M, Podgornik A, Štrancar A. Characterization of methacrylate monoliths for purification of DNA molecules. *J Sep Sci.* 2004;27:801–810.

- [116] Urthaler J, Schlegl R, Podgornik A, Štrancar A, Jungbauer A, Necina R. Application of monoliths for plasmid DNA purification: Development and transfer to production. *J Chromatogr A*. 2005;1065:93–106.
- [117] Mallik R, Tao J, Hage DS. High-performance affinity monolith chromatography: Development and evaluation of human serum albumin columns. *Anal Chem*. 2004;76:7013–7022.
- [118] Li YM, Liao JL, Nakazato K, Mohammad J, Terenius L, Hjertén S. Continuous beds for microchromatography: Cation-exchange chromatography. *Anal Biochem*. 1994;223:153–158.
- [119] Peters EC, Švec F, Fréchet JM, Viklund C, Irgum K. Control of porous properties and surface chemistry in „molded“ porous polymer monoliths prepared by polymerization in the presence of TEMPO. *Macromolecules*. 1999;32:6377–6379.
- [120] Sinner F, Buchmeiser MR. A new class of continuous polymer supports prepared by ring-opening metathesis polymerization: A straightforward route to functionalized monoliths. *Macromolecules*. 2000;33:5777–5786.
- [121] Sinner FM, Buchmeiser MR. Ring-opening metathesis polymerization: Access to a new class of functionalized, monolithic stationary phases for liquid chromatography. *Angew Chem, Int Ed*. 2000;39:1433–1436.
- [122] Buchmeiser MR. Metathesis-based monolithic supports: Synthesis, functionalization and applications. *Macromol Rapid Commun*. 2001;22:1081–1094.
- [123] Buchmeiser MR. New synthetic ways for the preparation of high-performance liquid chromatography supports. *J Chromatogr A*. 2001;918:233–266.
- [124] Lubbad S, Buchmeiser MR. Monolithic high-performance SEC supports prepared by ROMP for high-throughput screening of polymers. *Macromol Rapid Commun*. 2002;23:617–621.
- [125] Mayr B, Hölzl G, Eder K, Buchmeiser MR, Huber CG. Hydrophobic, pellicular, monolithic capillary columns based on cross-linked polynorbornene for biopolymer separations. *Anal Chem*. 2002;74:6080–6087.
- [126] Lubbad S, Mayr B, Huber CG, Buchmeiser MR. Micropreparative fractionation of DNA fragments on metathesis-based monoliths: Influence of stoichiometry on separation. *J Chromatogr A*. 2002;959:121–129.

- [127] Mayr B, Tessadri R, Post E, Buchmeiser MR. Metathesis-based monoliths: Influence of polymerization conditions on the separation of biomolecules. *Anal Chem.* 2001;73:4071–4078.
- [128] Gatschelhofer C, Magnes C, Pieber TR, Buchmeiser MR, Sinner FM. Evaluation of ring-opening metathesis polymerization (ROMP)-derived monolithic capillary high performance liquid chromatography columns. *J Chromatogr A.* 2005;1090:81–89.
- [129] Novak BM, Risse W, Grubbs RH. The development of well-defined catalysts for ring-opening olefin metathesis polymerizations (ROMP). *Adv Polym Sci.* 1992;102:47–72.
- [130] Schrock RR. Olefin metathesis by well-defined complexes of molybdenum and tungsten. *Top Organomet Chem.* 1998;1:1–36.
- [131] Wang JS, Matyjaszewski K. Controlled/„living“ radical polymerization. Atom transfer radical polymerization in the presence of transition-metal complexes. *J Am Chem Soc.* 1995;117:5614–5615.
- [132] Plieva FM, Galaev IY, Mattiasson B. Macroporous gels prepared at subzero temperatures as novel materials for chromatography of particulate-containing fluids and cell culture applications. *J Sep Sci.* 2007;30:1657–1671.
- [133] Dainiak MB, Galaev IY, Mattiasson B. Affinity cryogel monoliths for screening for optimal separation conditions and chromatographic separation of cells. *J Chromatogr A.* 2006;1123:145–150.
- [134] Plieva FM, Savina IN, Deraz S, Andersson J, Galaev IY, Mattiasson B. Characterization of supermacroporous monolithic polyacrylamide based matrices designed for chromatography of bioparticles. *J Chromatogr B.* 2004;807:129–137.
- [135] Arvidsson P, Plieva FM, Savina IN, Lozinsky VI, Fexby S, Bülow L, et al. Chromatography of microbial cells using continuous supermacroporous affinity and ion-exchange columns. *J Chromatogr A.* 2002;977:27–38.
- [136] Mallik R, Hage DS. Affinity monolith chromatography. *J Sep Sci.* 2006;29:1686–1704.
- [137] Nilsson C, Birnbaum S, Nilsson S. Use of nanoparticles in capillary and microchip electrochromatography. *J Chromatogr A.* 2007;1168:212–224.

- [138] Nischang I, Brüggemann O, Teasdale I. Facile, single-step preparation of versatile, high-surface-area, hierarchically structured hybrid materials. *Angew Chem, Int Ed.* 2011;50:4592–4596.
- [139] Wu M, Wu R, Li R, Qin H, Dong J, Zhang Z, et al. Polyhedral oligomeric silsesquioxane as a cross-linker for preparation of inorganic-organic hybrid monolithic columns. *Anal Chem.* 2010;82:5447–5454.
- [140] Zhu T, Row KH. Preparation and applications of hybrid organic-inorganic monoliths: A review. *J Sep Sci.* 2012;35:1294–1302.
- [141] Ma J, Liang Z, Qiao X, Deng Q, Tao D, Zhang L, et al. Organic-inorganic hybrid silica monolith based immobilized trypsin reactor with high enzymatic activity. *Anal Chem.* 2008;80:2949–2956.
- [142] Hilder EF, Švec F, Fréchet JMJ. Latex-functionalized monolithic columns for the separation of carbohydrates by micro anion-exchange chromatography. *J Chromatogr A.* 2004;1053:101–106.
- [143] Thayer JR, Flook KJ, Woodruff A, Rao S, Pohl CA. New monolith technology for automated anion-exchange purification of nucleic acids. *J Chromatogr B.* 2010;878:933–941.
- [144] Li Y, Chen Y, Xiang R, Ciuparu D, Pfefferle LD, Horváth C, et al. Incorporation of single-wall carbon nanotubes into an organic polymer monolithic stationary phase for  $\mu$ -HPLC and capillary electrochromatography. *Anal Chem.* 2005;77:1398–1406.
- [145] Xu Y, Cao Q, Švec F, Fréchet JMJ. Porous polymer monolithic column with surface-bound gold nanoparticles for the capture and separation of cysteine-containing peptides. *Anal Chem.* 2010;82:3352–3358.
- [146] Dobinson B, Hofmann W, Stark BP. Introduction. In: *The determination of epoxide groups.* Oxford: Pergamon Press; 1969. S. 1–17.
- [147] Parker RE, Isaacs NS. Mechanisms of epoxide reactions. *Chem Rev.* 1959;59:737–799.
- [148] Würtz MA. Mémoire sur les glycols ou alcools diatomiques. *Ann Chim Phys.* 1859;55:400–478.

- [149] Swern D. Epoxidation and hydroxylation of ethylenic compounds with organic peracids. *Org React.* 1953;7:378–433.
- [150] Becker HGO, Beckert R. Addition an nichtaktivierte C-C-Mehrfachbindungen. In: *Organikum, Organisch-chemisches Grundpraktikum*. 22. Ed. Weinheim: Wiley-VCH; 2004. S. 288–351.
- [151] ChemgaPedia. Reaktionen der Alkene; Juli 2013. Abgerufen unter: [http://www.chemgapedia.de/vsengine/vlu/vsc/de/ch/12/oc/vlu\\_organik/alkene/reaktionen\\_alkene.vlu.html](http://www.chemgapedia.de/vsengine/vlu/vsc/de/ch/12/oc/vlu_organik/alkene/reaktionen_alkene.vlu.html).
- [152] Prileschajew NA. Oxidation of unsaturated compounds with organic peroxides. 2. Oxidation of derivatives of unsaturated hydrocarbons with one double union. *J Chem Soc, Abstr.* 1912;6:348–349.
- [153] Prileschajew NA. Oxidation of unsaturated compounds by organic peroxides. *J Chem Soc, Abstr.* 1912;6:2407–2409.
- [154] Prileschajew N. Oxydation ungesättigter Verbindungen mittels organischer Superoxyde. *Ber Dtsch Chem Ges.* 1909;42:4811–4815.
- [155] Prileschajew NA. *Russ J Phys Ch Ussr.* 1910;42:1387.
- [156] Prileschajew NA. *Russ J Phys Ch Ussr.* 1912;44:613.
- [157] Prileschajew NA. *Russ J Phys Ch Ussr.* 1911;43:609.
- [158] Brückner R. Addition an die olefinische C=C-Doppelbindung. In: *Reaktionsmechanismen, Organische Reaktionen, Stereochemie, Moderne Synthesemethoden*. 3. Ed. Heidelberg: Spektrum, Akademischer Verlag; 2007. S. 105–159.
- [159] Katsuki T, Sharpless KB. The first practical method for asymmetric epoxidation. *J Am Chem Soc.* 1980;102:5974–5976.
- [160] Ko SY, Lee AWM, Masamune S, Reed LA, Sharpless KB, Walker FJ. Total synthesis of the L-hexoses. *Tetrahedron.* 1990;46:245–264.
- [161] Pfenninger A. Asymmetric epoxidation of allylic alcohols: The SHARPLESS epoxidation. *Ceram Trans.* 1986;:-89–116.
- [162] Katsuki T, Martin VS. Asymmetric epoxidation of allylic alcohols: The KATSUKI-SHARPLESS epoxidation reaction. *Organic Reactions.* 1996;48:1–299.



- [163] The Nobel Foundation. Sharpless, KB; August 2013. Abgerufen unter: [http://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/chemistry/laureates/2001/sharpless-facts.html](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2001/sharpless-facts.html).
- [164] Jacobsen EN, Zhang W, Muci AR, Ecker JR, Deng L. Highly enantioselective epoxidation catalysts derived from 1,2-diaminocyclohexane. *J Am Chem Soc.* 1991;113:7063–7064.
- [165] Linker T. Die Kontroverse um den Mechanismus der JACOBSEN-KATSUKI-Epoxidierung. *Angew Chem.* 1997;109:2150–2152.
- [166] Becker HGO, Beckert R. Reaktionen von Carbonylverbindungen. In: *Organikum, Organisch-chemisches Grundpraktikum*. 22. Ed. Weinheim: Wiley-VCH; 2004. S. 456–622.
- [167] Tu Y, Wang ZX, Shi Y. An efficient asymmetric epoxidation method for *trans*-olefins mediated by a fructose-derived ketone. *J Am Chem Soc.* 1996;118:9806–9807.
- [168] Wang ZX, Tu Y, Frohn M, Zhang JR, Shi Y. An efficient catalytic asymmetric epoxidation method. *J Am Chem Soc.* 1997;119:11224–11235.
- [169] Corey EJ, Chaykovsky M. Dimethyloxosulfonium methylide ((CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SOCH<sub>2</sub>) and dimethylsulfonium methylide ((CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SCH<sub>2</sub>). Formation and application to organic synthesis. *J Am Chem Soc.* 1965;87:1353–1364.
- [170] Johnson AW, LaCount RB. The chemistry of ylids. 6. Dimethylsulfonium fluorenylide - A synthesis of epoxides. *J Am Chem Soc.* 1961;83:417–423.
- [171] Darzens MG. Méthode générale de synthèse des aldéhydes à l'aide des acides glycidiques substitués. *C R Hebd Séances Acad Sci.* 1904;139:1214–1217.
- [172] Darzens MG. Condensation glycidique des aldéhydes avec l'éther  $\alpha$ -chloropropionique. *C R Hebd Séances Acad Sci.* 1906;142:214–215.
- [173] Darzens MG. Méthode générale de synthèse d'éthers glycidique  $\alpha\beta$  substitués et de cétones. *C R Hebd Séances Acad Sci.* 1905;141:766–768.
- [174] Newman MS. The DARZENS glycidic ester condensation. *Org React.* 1948;5:413–440.
- [175] May SW. Enzymatic epoxidation reactions. *Enzyme Microb Technol.* 1979;1:15–22.

- [176] Brückner R. Umlagerungen. In: Reaktionsmechanismen, Organische Reaktionen, Stereochemie, Moderne Synthesemethoden. 3. Ed. Heidelberg: Spektrum, Akademischer Verlag; 2007. S. 589–635.
- [177] Kolaczinski G, Mehren R, Stein W. Über die Umlagerung unverzweigter 1,2-Epoxide mit Lewissäuren. *Fette, Seifen, Anstrichm.* 1971;73:553–557.
- [178] Becker HGO, Beckert R. Umlagerungen. In: Organikum, Organisch-chemisches Grundpraktikum. 22. Ed. Weinheim: Wiley-VCH; 2004. S. 659–682.
- [179] Faure K, Delaunay N, Alloncle G, Cotte S, Rocca JL. Optimization of *in-situ* monolithic synthesis for immunopreconcentration in capillary. *J Chromatogr A.* 2007;1149:145–150.
- [180] Vlach EG, Tennikova TB. Solid phase peptide synthesis on macroporous methacrylate monoliths. *J Pept Sci.* 2004;10:719–730.
- [181] Ostryanina ND, Vlasov GP, Tennikova TB. Multifunctional fractionation of polyclonal antibodies by immunoaffinity high-performance monolithic disk chromatography. *J Chromatogr A.* 2002;949:163–171.
- [182] Korol'kov VI, Platonova GA, Azanova VV, Tennikova TB, Vlasov GP. *In situ* preparation of peptidylated polymers as ready-to-use adsorbents for rapid immunoaffinity chromatography. *Lett Pept Sci.* 2000;7:53–61.
- [183] Pfliegerl K, Podgornik A, Berger E, Jungbauer A. Screening for peptide affinity ligands on CIM monoliths. *Biotechnol Bioeng.* 2002;79:733–740.
- [184] Pfliegerl K, Podgornik A, Berger E, Jungbauer A. Direct synthesis of peptides on Convective Interaction Media monolithic columns for affinity chromatography. *J Comb Chem.* 2001;4:33–37.
- [185] Švec F, Fréchet JMJ. Continuous rods of macroporous polymer as high-performance liquid chromatography separation media. *Anal Chem.* 1992;64:820–822.
- [186] Tsujioka N, Ishizuka N, Tanaka N, Kubo T, Hosoya K. Well-controlled 3D skeletal epoxy-based monoliths obtained by polymerization induced phase separation. *J Polym Sci, Part A: Polym Chem.* 2008;46:3272–3281.

- [187] Tsujioka N, Hira N, Aoki S, Tanaka N, Hosoya K. A new preparation method for well-controlled 3D skeletal epoxy resin-based polymer monoliths. *Macromolecules*. 2005;38:9901–9903.
- [188] Kubo T, Tominaga Y, Yasuda K, Fujii S, Watanabe F, Mori T, et al. Spontaneous water cleanup using an epoxy-based polymer monolith. *Anal Methods*. 2010;2:570–574.
- [189] Kubo T, Yasuda K, Tominaga Y, Otsuka K, Hosoya K. Antibacterial activities effectuated by *co*-continuous epoxy-based polymer materials. *Colloids Surf, B*. 2013;107:53–58.
- [190] Takahashi T, Odagiri K, Watanabe A, Watanabe C, Kubo T, Hosoya K. Solid-phase extraction element based on epoxy polymer monolith for determination of polar organic compounds in aqueous media. *J Sep Sci*. 2011;34:2925–2932.
- [191] Hosoya K, Sakamoto M, Akai K, Mori T, Kubo T, Kaya K, et al. A novel chip device based on wired capillary packed with high performance polymer-based monolith for HPLC: Reproducibility in preparation processes to obtain long columns. *Anal Sci*. 2008;24:149–154.
- [192] Hosoya K, Hira N, Yamamoto K, Nishimura M, Tanaka N. High-performance polymer-based monolithic capillary column. *Anal Chem*. 2006;78:5729–5735.
- [193] Hosoya K, Mori T, Sakamoto M, Kubo T, Kaya K. Properties of a non-aromatic epoxy polymer-based monolithic capillary column for  $\mu$ -HPLC. *Chromatographia*. 2009;70:699–704.
- [194] Nguyen AM, Irgum K. Epoxy-based monoliths. A novel hydrophilic separation material for liquid chromatography of biomolecules. *Chem Mater*. 2006;18:6308–6315.
- [195] Nguyen AM, Dinh NP, Cam QM, Sparrman T, Irgum K. Preparation and characterization of sizable macroporous epoxy resin-based monolithic supports for flow-through systems. *J Sep Sci*. 2009;32:2608–2618.
- [196] Tu J, Du ZJ, Li HQ, Zhang C. Development and characterization of porous epoxy monoliths via pore-initiated polymerization. *Colloids Surf, A*. 2011;375:68–75.
- [197] Raschig GmbH. Chemie Sparte, Epoxide - Glycidether; August 2013. Abgerufen unter: <http://www.raschig.de/Epoxide---Glycidether>.

- [198] Nissan Chemical America Corporation. TEPIC®; Oktober 2013. Abgerufen unter: <http://www.nissanchem-usa.com/tepic.php>.
- [199] Erikstam U, Bruze M, Goossens A. Degradation of triglycidyl isocyanurate as a cause of false-negative patch test reaction. *Contact Dermatitis*. 2001;44:13–17.
- [200] Ichihara J, Hanafusa T. The combination of hydrogen fluoride salt and aluminium fluoride: An efficient solid reagent for epoxide opening to give fluorohydrins. *J Chem Soc, Chem Commun*. 1989;:1848–1850.
- [201] Ikeda I, Gu XP, Miyamoto I, Okahara M. Preparation of 1,3-diacylglycerols and 1-alkyl-3-acylglycerols in the presence of quaternary ammonium salt. *J Am Oil Chem Soc*. 1989;66:822–824.
- [202] Sutowardoyo KI, Sinou D. Ring-opening of glycidyl derivatives by silanes mediated by  $\text{Ti}(\text{O-}i\text{-Pr})_4$  or  $\text{Al}(\text{O-}i\text{-Pr})_3$ : Access to versatile  $\text{C}_3$  building blocks. *Tetrahedron: Asymmetry*. 1991;2:437–444.
- [203] Kida T, Yokota M, Masuyama A, Nakatsuji Y, Okahara M. A facile synthesis of polyglycidyl ethers from polyols and epichlorohydrin. *Synthesis*. 1993;5:487–489.
- [204] Frey H, Haag R. Dendritic polyglycerol: A new versatile biocompatible material. *Rev Mol Biotechnol*. 2002;90:257–267.
- [205] Han H, Xu Hj, Chen Dd, Hu Hl, Zhao Xc. Synthesis and surface chemical properties of trimeric anionic surfactant. *Riyong Huaxue Gongye*. 2008;38:277–281.
- [206] Budnowski M. Herstellung und Eigenschaften der diastereomeren Triglycidylisocyanurate. *Angew Chem*. 1968;80:851–852.
- [207] Urata K, Yano S, Kawamata A, Takaishi N, Inamoto Y. A convenient synthesis of long-chain 1-*o*-Alkyl glyceryl ethers. *J Am Oil Chem Soc*. 1988;65:1299–1302.
- [208] Najem L, Borredon ME. Single step etherification of fatty alcohols by an epichlorohydrin. *Synth Commun*. 1994;24:3021–3030.
- [209] Kang HC, Lee BM, Yoon J, Yoon M. Improvement of the phase-transfer catalysis method for synthesis of glycidyl ether. *J Am Oil Chem Soc*. 2000;78:423–429.
- [210] Malinovskii MS. Polymerization of epoxides. In: *Epoxides and their derivatives*. Jerusalem: Israel Program for Scientific Translations Ltd.; 1965. S. 347–351.

- [211] Ravve A. Polymerization of oxiranes. In: Principles of polymer chemistry. 3. Ed. New York: Springer; 2012. S. 253–327.
- [212] Ryan AJ, Vaidya UR, Mormann W, Macosko CW. Networks by fast epoxy polymerization. Polym Bull. 1990;24:521–527.
- [213] Ballard SA, Rupert CM, Van Winkle JL. Polymeric  $\alpha$ -butylene oxide. J Chem Soc, Abstr. 1950;44:7868–7869.
- [214] Arnold RJ. Acceleration of glycidyl epoxy resin-anhydride reactions. Mod Plast. 1964;41:149–186.
- [215] Chen CS, Pearce EM. The boron trifluoride monoethyl amine complex cured epoxy resins. J Appl Polym Sci. 1989;37:1105–1124.
- [216] Harris JJ, Temin SC. Proposed mechanism for the curing of epoxy resins with amine-lewis acid complexes or salts. J Appl Polym Sci. 1966;10:523–534.
- [217] Munns TE, Seferis JC. High performance epoxy resins cured in the presence of  $\text{BF}_3$  catalyst. J Appl Polym Sci. 1983;28:2227–2233.
- [218] Matějka L, Chabanne P, Tighzert L, Pascault JP. Cationic polymerization of diglycidyl ether of bisphenol A. J Polym Sci, Part A: Polym Chem. 1994;32:1447–1458.
- [219] Bednarek M, Kubisa P, Penczek S. Polymerization of propylene oxide by activated monomer mechanism - kinetics. Makromol Chem. 1989;15:49–60.
- [220] Flemming M, Ziegmann G, Roth S. Epoxidharze (EP). In: Faserverbundbauwesen: Fasern und Matrices. Berlin: Springer-Verlag; 1995. S. 205.
- [221] Würtz A. Sur l'oxyde d'éthylène. C R Hebd Séances Acad Sci. 1859;48:101.
- [222] Nicolet BH, Poulet TC. Epoxy acids from oleic and elaidic acids. J Am Chem Soc. 1930;52:1186–1191.
- [223] Dobinson B, Hofmann W, Stark BP. The determination of epoxide groups. Oxford: Pergamon Press; 1969.
- [224] Durbetaki AJ. Direct titration of oxirane oxygen with hydrogen bromide in acetic acid. Anal Chem. 1956;28:2000–2001.

- [225] DIN EN 1877-1. Produkte und Systeme für den Schutz und die Instandsetzung von Betontragwerken - Prüfverfahren - Reaktive, funktionelle Gruppen von Epoxidharzen - Teil 1: Bestimmung des Expoxid-Äquivalents. Berlin: Beuth Verlag; Dezember 2000.
- [226] DIN EN ISO 3001. Kunststoffe - Epoxid-Verbindungen - Bestimmungen des Epoxid-Äquivalents. Berlin: Beuth Verlag; November 1999.
- [227] DIN 16945. Reaktionsharze, Reaktionsmittel und Reaktionsharzmassen; Prüfverfahren. Berlin: Beuth Verlag; März 1989.
- [228] Siggia S, Hanna JG. Epoxide groups (oxirane oxygen). In: Quantitative organic analysis via functional groups. 4. Ed. New York: Wiley; 1979. S. 304–324.
- [229] Swan JD. Determination of epoxides with sodium sulfite. Anal Chem. 1954;26:878–880.
- [230] Meyer K, Lorenz P, Böhl-Kuhn B, Klobes P. Porous solids and their characterization - Methods of investigation and application. Cryst Res Technol. 1994;29:903–930.
- [231] Baiker A, Richarz W. Vergleich der Meßmethoden zur Bestimmung der Porenradienverteilung und spezifischen Oberfläche poröser Katalysatoren. Chem Ing Tech. 1977;49:399–403.
- [232] Greiderer A, Ligon SC, Huck CW, Bonn GK. Organic monoliths as stationary phases in chromatography. In: Wang PG, Hrsg. Monolithic chromatography and its modern application. St Albans: ILM Publications; 2010. S. 161–164.
- [233] DIN 66133. Bestimmung der Porenvolumenverteilung und der spezifischen Oberfläche von Feststoffen durch Quecksilberintrusion. Berlin: Beuth Verlag; Juni 1993.
- [234] Klobes P, Meyer K, Munro RG. Pore analysis by mercury intrusion techniques (mercury porosimetry). In: Porosity and specific surface area measurements for solid materials. Washington: National Institute of Standards and Technology; 2006. S. 40–47.
- [235] Washburn EW. The dynamics of capillary flow. Phys Rev. 1921;17:273–283.
- [236] Washburn EW. Note on a method of determining the distribution of pore sizes in a porous material. Proc Natl Acad Sci USA. 1921;7:115–116.

- [237] Rouquerol J, Baron G, Denoyel R, Giesche H, Groen J, Klobes P, et al. Liquid intrusion and alternative methods for the characterization of macroporous materials (IUPAC technical report). *Pure Appl Chem*. 2012;84:107–136.
- [238] Fadeev AY, Eroshenko VA. Study of penetration of water into hydrophobized porous silicas. *J Colloid Interface Sci*. 1997;187:275–282.
- [239] Lefevre B, Saugey A, Barrat JL, Bocquet L, Charlaix E, Gobin PF, et al. Intrusion and extrusion of water in hydrophobic mesopores. *J Chem Phys*. 2004;120:4927–4938.
- [240] Drake LC, Ritter HL. Pore-size distribution in porous materials. 2. Macropore-size distributions in some typical porous substances. *Ind Eng Chem, Anal Ed*. 1945;17:787–791.
- [241] Ritter HL, Drake LC. Pore-size distribution in porous materials. 1. Pressure porosimeter and determination of complete macropore-size distributions. *Ind Eng Chem, Anal Ed*. 1945;17:782–786.
- [242] Technische Universität Dresden. Holz- und Faserwerkstofftechnik, Projekte; August 2013. Abgerufen unter: [http://tu-dresden.de/die\\_tu\\_dresden/fakultaeten/fakultaet\\_maschinenwesen/ihp/hft/forschung/basics/ProjekteGL](http://tu-dresden.de/die_tu_dresden/fakultaeten/fakultaet_maschinenwesen/ihp/hft/forschung/basics/ProjekteGL).
- [243] León y León CA. New perspectives in mercury porosimetry. *Adv Colloid Interface Sci*. 1998;76-77:341–372.
- [244] Meyer K, Klobes P, Röhl-Kuhn B. Certification of reference material with special emphasis on porous solids. *Cryst Res Technol*. 1997;32:175–185.
- [245] Felipe C, Cordero S, Kornhauser I, Zgrablich G, López R, Rojas F. Domain complexion diagrams related to mercury intrusion-extrusion in Monte Carlo-simulated porous networks. *Part Part Syst Charact*. 2006;23:48–60.
- [246] Rootare HM, Prenzlow CF. Surface areas from mercury porosimeter measurements. *J Phys Chem*. 1967;71:2733–2736.
- [247] Miller B, Tyomkin I. Liquid porosimetry: New methodology and applications. *J Colloid Interface Sci*. 1994;162:163–170.
- [248] DIN 66131. Bestimmung der spezifischen Oberfläche von Feststoffen durch Gasadsorption nach Brunauer, Emmett und Teller (BET); Grundlagen. Berlin: Beuth Verlag; Juli 1993.

- [249] Klobes P, Meyer K, Munro RG. Specific surface area and pore analysis by gas adsorption. In: Porosity and specific surface area measurements for solid materials. Washington: National Institute of Standards and Technology; 2006. S. 23–40.
- [250] Klobes P, Meyer K, Munro RG. Porous and highly dispersed solids. In: Porosity and specific surface area measurements for solid materials. Washington: National Institute of Standards and Technology; 2006. S. 4–14.
- [251] McClellan AL, Harnsberger HF. Cross-sectional areas of molecules adsorbed on solid surfaces. *J Colloid Interface Sci.* 1967;23:577–599.
- [252] ISO 9277. Determination of the specific surface area of solids by gas adsorption - BET method. Berlin: Beuth Verlag; September 2010.
- [253] Sing KSW, Everett DH, Haul RAW, Moscou L, Pierotti RA, Rouquerol J, et al. Reporting physisorption data for gas solid systems with special reference to the determination of surface-area and porosity. *Pure Appl Chem.* 1985;57:603–619.
- [254] Brunauer S, Emmett PH, Teller E. Adsorption of gases in multimolecular layers. *J Am Chem Soc.* 1938;60:309–319.
- [255] Langmuir I. The adsorption of gases on plane surfaces of glass, mica and platinum. *J Am Chem Soc.* 1918;40:1361–1403.
- [256] Gregg SJ, Sing KSW. Physical adsorption of gases by non-porous solids. In: Adsorption, surface area and porosity. London: Academic Press; 1967. S. 35–120.
- [257] Linsen BG, van den Heuvel A. Pore structures. In: Flood EA, Hrsg. The solid-gas interface. New York: Dekker; 1967. S. 1025–1053.
- [258] Barrett EP, Leslie GJ, Halenda PH. The determination of pore volume and area distributions in porous substances. 1. Computations from nitrogen isotherms. *J Am Chem Soc.* 1951;73:373–380.
- [259] de Boer JH, Linsen BG, Osinga TJ. Studies on pore systems in catalysts, 6. The universal *t* curve. *J Catal.* 1965;4:643–648.
- [260] Moore JC. Gel permeation chromatography. 1. New method for molecular weight distribution of high polymers. *J Polym Sci, Part A: Gen Pap.* 1964;2:835–843.
- [261] Pedersen KO. Exclusion chromatography. *Arch Biochem Biophys.* 1962;Suppl 1:157–68.



- 
- [262] Porath J, Flodin P. Gel filtration: A method for desalting and group separation. *Nature*. 1959;183:1657–1659.
- [263] Determann H. Einführung. In: *Gelchromatographie, Gelfiltration, Gelpermeation, Molekülsiebe - Ein Laboratoriumsbuch*. Berlin: Springer-Verlag; 1967. S. 1–13.
- [264] van Krevelde ME, van den Hoed N. Mechanism of gel permeation chromatography: Distribution coefficient. *J Chromatogr A*. 1973;83:111–124.
- [265] Striegel AM, Yau WW, Kirkland JJ, Bly DD. Background. In: *Modern size-exclusion liquid chromatography, Practice of gel permeation and gel filtration chromatography*. 2. Ed. Hoboken: Wiley; 2009. S. 1–17.
- [266] Miller JM. Physical forces and molecular interactions. In: *Chromatography: Concepts and contrasts*. New York: Wiley; 1988. S. 40–52.
- [267] Kuo CY, Provder T. Detection and data analysis in size exclusion chromatography. *ACS Symp Ser*. 1987;352:2–28.
- [268] Kim DH, Johnson AF. Computer model for gel permeation chromatography of polymers. *ACS Symp Ser*. 1984;245:25–45.
- [269] Halász I, Martin K. Pore sizes of solids. *Angew Chem, Int Ed Engl*. 1978;17:901–908.
- [270] Al-Bokari M, Cherrak D, Guiochon G. Determination of the porosities of monolithic columns by inverse size-exclusion chromatography. *J Chromatogr A*. 2002;975:275–284.
- [271] Aggebrandt LG, Samuelson O. Penetration of water-soluble polymers into cellulose fibers. *J Appl Polym Sci*. 1964;8:2801–2812.
- [272] Ousalem M, Zhu XX, Hradil J. Evaluation of the porous structures of new polymer packing materials by inverse size-exclusion chromatography. *J Chromatogr A*. 2000;903:13–19.
- [273] Freeman DH, Poinescu IC. Particle porosimetry by inverse gel permeation chromatography. *Anal Chem*. 1977;49:1183–1188.
- [274] Freeman DH, Schram SB. Characterization of microporous polystyrene-divinylbenzene copolymer gels by inverse gel permeation chromatography. *Anal Chem*. 1981;53:1235–1238.

- [275] Halász I, Vogtel P. Determination of morphological properties of swellable solids by size exclusion chromatography. *Angew Chem, Int Ed Engl.* 1980;19:24–28.
- [276] Hradil J. Contribution to the study of the submicroscopic structure of macroporous polymers. Calculation of the magnitude of submicroscopic particles and pores from specific pore volumes and specific surfaces. *Angew Makromol Chem.* 1978;66:51–66.
- [277] Hradil J, Horák D, Pelzbauer Z, Votavová E, Švec F, Kálal J. Investigation of the surface structure of polymers by chromatographic methods: 5. Use of gel permeation chromatography in the study of the porous structure of copolymers of glycidyl methacrylate. *J Chromatogr A.* 1983;259:269–282.
- [278] Jeřábek K. Determination of pore volume distribution from size exclusion chromatography data. *Anal Chem.* 1985;57:1595–1597.
- [279] Jeřábek K. Characterization of swollen polymer gels using size exclusion chromatography. *Anal Chem.* 1985;57:1598–1602.
- [280] Jeřábek K, Setínek K, Hradil J, Švec F. An investigation of the morphology of glycidyl methacrylate copolymers using inverse size-exclusion chromatography. *React Polym, Ion Exch, Sorbents.* 1987;5:151–156.
- [281] Knox JH, Scott HP. Theoretical models for size-exclusion chromatography and calculation of pore size distribution from size-exclusion chromatography data. *J Chromatogr A.* 1984;316:311–332.
- [282] Schram SB, Freeman DH. Characterization of LC stationary phases by inverse size exclusion chromatography. *J Liq Chromatogr.* 1980;3:403–417.
- [283] Warren FV, Bidlingmeyer BA. Determination of pore size distributions of liquid chromatographic column packings by gel permeation chromatography. *Anal Chem.* 1984;56:950–957.
- [284] Hagel L, Östberg M, Andersson T. Apparent pore size distributions of chromatography media. *J Chromatogr A.* 1996;743:33–42.
- [285] Knox JH, Ritchie HJ. Determination of pore size distribution curves by size-exclusion chromatography. *J Chromatogr A.* 1987;387:65–84.

- 
- [286] Urban J, Eeltink S, Jandera P, Schoenmakers PJ. Characterization of polymer-based monolithic capillary columns by inverse size-exclusion chromatography and mercury-intrusion porosimetry. *J Chromatogr A*. 2008;1182:161–168.
- [287] Gorbunov AA, Solovyova LY, Pasechnik VA. Fundamentals of the theory and practice of polymer gel-permeation chromatography as a method of chromatographic porosimetry. *J Chromatogr A*. 1988;448:307–332.
- [288] Dauwe C, Kilz P. Chromatographische Porengrößenanalysen offenporiger Materialien. *Chem Labor Biotech*. 2001;2:60–62.
- [289] Vilenchik LZ, Asrar J, Ayotte RC, Ternorutsky L, Hardiman CJ. Macromolecular porosimetry. *J Chromatogr A*. 1993;648:9–17.
- [290] Jeřábek K, Revillon A, Puccilli E. Pore structure characterization of organic-inorganic materials by inverse size exclusion chromatography. *Chromatographia*. 1993;36:259–262.
- [291] Berthold J, Salmén L. Inverse size exclusion chromatography (ISEC) for determining the relative pore size distribution of wood pulps. *Holzforschung*. 1997;51:361–368.
- [292] Hradil J, Králová E. Styrene-divinylbenzene copolymers post-crosslinked with tetrachloromethane. *Polymer*. 1998;39:6041–6048.
- [293] Hradil J, Králová E, Beneš MJ. Methacrylate anion exchangers with enhanced affinity for nitrates. *React Funct Polym*. 1997;33:263–273.
- [294] Podlesnyuk VV, Hradil J, Marutovskii RM, Klimenko NA, Fridman LE. Sorption of organic compounds from aqueous solutions by glycidyl methacrylate-styrene-ethylene dimethacrylate terpolymers. *React Funct Polym*. 1997;33:275–288.
- [295] DePhillips P, Lenhoff AM. Pore size distributions of cation-exchange adsorbents determined by inverse size-exclusion chromatography. *J Chromatogr A*. 2000;883:39–54.
- [296] Ettre LS. Nomenclature for chromatography. *Pure Appl Chem*. 1993;65:819–872.
- [297] Lubda D, Lindner W, Quaglia M, Hohenesche CdFv, Unger KK. Comprehensive pore structure characterization of silica monoliths with controlled mesopore size and macropore size by nitrogen sorption, mercury porosimetry, transmission

- electron microscopy and inverse size exclusion chromatography. *J Chromatogr A*. 2005;1083:14–22.
- [298] Danilatos GD. Theory of the gaseous detector device in the environmental scanning electron microscope. *Adv Electron Electron Phys*. 1990;78:1–102.
- [299] Danilatos GD. Foundations of environmental scanning electron microscopy. *Adv Electron Electron Phys*. 1988;71:109–250.
- [300] Danilatos GD. Principles of scanning electron microscopy at high specimen chamber pressures. *Scanning*. 1979;2:72–82.
- [301] Stokes DJ. Recent advances in electron imaging, image interpretation and applications: Environmental scanning electron microscopy. *Philos Trans R Soc, A*. 2003;361:2771–2787.
- [302] Ebert M, Inerle-Hof M, Weinbruch S. Environmental scanning electron microscopy as a new technique to determine the hygroscopic behaviour of individual aerosol particles. *Atmos Environ*. 2002;36:5909–5916.
- [303] McKinlay KJ, Allison FJ, Scotchford CA, Grant DM, Oliver JM, King JR, et al. Comparison of environmental scanning electron microscopy with high vacuum scanning electron microscopy as applied to the assessment of cell morphology. *J Biomed Mater Res, Part A*. 2004;69A:359–366.
- [304] Donald AM. The use of environmental scanning electron microscopy for imaging wet and insulating materials. *Nat Mater*. 2003;2:511–516.
- [305] DIN EN ISO 868. Kunststoffe und Hartgummi - Bestimmung der Eindruckhärte mit einem Durometer (Shore-Härte). Berlin: Beuth Verlag; Oktober 2003.
- [306] DIN 53505. Prüfung von Kautschuk und Elastomeren - Härteprüfung nach Shore A und Shore D. Berlin: Beuth Verlag; August 2000.
- [307] DIN 53519-2. Prüfung von Elastomeren - Bestimmung der Kugeldruckhärte von Weichgummi, Internationaler Gummihärtegrad (IRHD), Härteprüfung an Proben geringer Abmessungen, Mikrohartprüfung. Berlin: Beuth Verlag; Mai 1972.
- [308] DIN 53519-1. Prüfung von Elastomeren - Bestimmung der Kugeldruckhärte von Weichgummi, Internationaler Gummihärtegrad (IRHD), Härteprüfung an Normproben. Berlin: Beuth Verlag; Mai 1972.

- [309] Starcher B. A ninhydrin-based assay to quantitate the total protein content of tissue samples. *Anal Biochem.* 2001;292:125–129.
- [310] Hische EA, van der Helm HJ, van Meegan MT, Blanken HI. Protein estimation in cerebrospinal fluid with Coomassie Brilliant Blue. *Clin Chem.* 1982;28:1236–7.
- [311] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248–254.
- [312] Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem.* 1985;150:76–85.
- [313] Stich TM. Determination of protein covalently bound to agarose supports using bicinchoninic acid. *Anal Biochem.* 1990;191:343–346.
- [314] Kim HS, Hage DS. Immobilization methods for affinity chromatography. In: Hage DS, Hrsg. *Handbook of affinity chromatography*. 2. Ed. Boca Raton: CRC Press, Taylor & Francis Group; 2006. S. 35–78.
- [315] Hermanson GT, Mallia AK, Smith PK. Measurement of activation level and immobilized ligand density. In: *Immobilized affinity ligand techniques*. San Diego, CA: Academic Press; 1992. S. 281–316.
- [316] Smith IK, Vierheller TL, Thorne CA. Assay of glutathione reductase in crude tissue homogenates using 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid). *Anal Biochem.* 1988;175:408–413.
- [317] Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys.* 1959;82:70–77.
- [318] Ellman GL. A colorimetric method for determining low concentrations of mercaptans. *Arch Biochem Biophys.* 1958;74:443–450.
- [319] Riddles PW, Blakeley RL, Zerner B. Ellman's reagent: 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) - A reexamination. *Anal Biochem.* 1979;94:75–81.
- [320] Whitesides GM, Lilburn JE, Szajewski RP. Rates of thiol-disulfide interchange reactions between mono- and dithiols and Ellman's reagent. *J Org Chem.* 1977;42:332–338.
- [321] Danehy JP, Elia VJ, Lavelle CJ. Alkaline decomposition of organic disulfides. 4. Limitation on use of Ellman's reagent, 2,2'-dinitro-5,5'-dithiodibenzoic acid. *J Org Chem.* 1971;36:1003–1005.

- [322] Brockleth K, Little G. Reactions of papain and of low-molecular-weight thiols with some aromatic disulfides - 2,2'-dipyridyl disulfide as a convenient active-site titrant for papain even in presence of other thiols. *Biochem J.* 1973;133:67–80.
- [323] Langone JJ. Applications of immobilized protein A in immunochemical techniques. *J Immunol Methods.* 1982;55:277–296.
- [324] Labrou NE. Design and selection of ligands for affinity chromatography. *J Chromatogr B.* 2003;790:67–78.
- [325] Ostrove S. Affinity chromatography: General methods. *Methods Enzymol.* 1990;182:357–371.
- [326] Roque ACA, Lowe CR. Affinity chromatography - History, perspectives, limitations and prospects. In: Zachariou M, Hrsg. *Affinity chromatography, Methods and protocols.* 2. Ed. Totowa, NJ: Humana Press; 2008. S. 1–21.
- [327] Urh M, Simpson D, Zhao K. Affinity chromatography: General methods. In: Burgess RR, Deutscher MP, Hrsg. *Guide to protein purification.* 2. Ed. *Methods in Enzymology.* Madison: Elsevier Academic Press; 2009. S. 417–438.
- [328] Alexander C, Andersson HS, Andersson LI, Ansell RJ, Kirsch N, Nicholls IA, et al. Molecular imprinting science and technology: A survey of the literature for the years up to and including 2003. *J Mol Recognit.* 2006;19:106–180.
- [329] *Affinity chromatography, Principles and methods.* Uppsala: GE Healthcare Bio-Sciences AB; 2007.
- [330] Starkenstein E. Über Fermentwirkung und deren Beeinflussung durch Neutralsalze. *Biochem Z.* 1910;24:210–218.
- [331] Campbell DH, Luescher E, Lerman LS. Immunologic adsorbents. 1. Isolation of antibody by means of a cellulose-protein antigen. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1951;37:575–578.
- [332] Cuatrecasas P, Wilchek M, Anfinsen CB. Selective enzyme purification by affinity chromatography. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1968;61:636–643.
- [333] Lerman LS. A biochemically specific method for enzyme isolation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1953;39:232–236.
- [334] Lerman LS. Antibody chromatography on an immunologically specific adsorbent. *Nature.* 1953;172:635–636.

- [335] Renkin EM. Filtration, diffusion, and molecular sieving through porous cellulose membranes. *J Gen Physiol.* 1954;38:225–243.
- [336] Hage DS, Bian M, Burks R, Karle E, Ohnmacht C, Wa C. Bioaffinity chromatography. In: Hage DS, Hrsg. *Handbook of affinity chromatography*. 2. Ed. Boca Raton: CRC press/Taylor and Francis Group; 2006. S. 107–135.
- [337] Guss B, Eliasson M, Olsson A, Uhlén M, Frej AK, Jörnvall H, et al. Structure of the IgG-binding regions of *streptococcal* protein G. *EMBO J.* 1986;5:1567–1575.
- [338] Jiang T, Mallik R, Hage DS. Affinity monoliths for ultrafast immunoextraction. *Anal Chem.* 2005;77:2362–2372.
- [339] Tetala KKR, van Beek TA. Bioaffinity chromatography on monolithic supports. *J Sep Sci.* 2010;33:422–438.
- [340] Luo Q, Zou H, Zhang Q, Xiao X, Ni J. High-performance affinity chromatography with immobilization of protein A and L-histidine on molded monolith. *Biotechnol Bioeng.* 2002;80:481–489.
- [341] Petro M, Švec F, Fréchet JMJ. Immobilization of trypsin onto „molded“ macroporous poly(glycidyl methacrylate-co-ethylene dimethacrylate) rods and use of the conjugates as bioreactors and for affinity chromatography. *Biotechnol Bioeng.* 1996;49:355–363.
- [342] Ruhn PF, Garver S, Hage DS. Development of dihydrazide-activated silica supports for high-performance affinity chromatography. *J Chromatogr A.* 1994;669:9–19.
- [343] Xuan H, Hage DS. Immobilization of  $\alpha_1$ -acid glycoprotein for chromatographic studies of drug-protein binding. *Anal Biochem.* 2005;346:300–310.
- [344] Notification NIC, (Australia) AS. Triglycidylisocyanurate (TGIC) : full public report / National Industrial Chemicals Notification and Assessment Scheme. Priority existing chemical; no. 1; 1994.
- [345] DIN 66135-1. Partikelmesstechnik - Mikroporenanalyse mittels Gasadsorption - Teil 1: Grundlagen und Messverfahren. Berlin: Beuth Verlag; Juni 2001.
- [346] DIN 66134. Bestimmung der Porengrößenverteilung und der spezifischen Oberfläche mesoporöser Feststoffe durch Stickstoffsorption - Verfahren nach Barrett, Joyner und Halenda (BJH). Berlin: Beuth Verlag; Februar 1998.

- [347] Joel D, Becker H. Isomere des Triglyzidylisocyanurats. *Plaste Kautsch.* 1976;23:237–239.
- [348] Hauptverband der gewerblichen Berufsgenossenschaften Fachausschuss „Chemie“. Verfahren zur Bestimmung von Triglycidylisocyanurat (TGIC); April 1999.
- [349] Bechtle M. Preparation of macroporous methacrylate-based monoliths for chromatographic applications, Dissertation. ETH Zürich; 2009.
- [350] Zubrick JW. Distillation. In: *The organic chem lab survival manual: A student's guide to techniques*. 8. Ed. Hoboken: John Wiley & Sons; 2011. S. 164–189.
- [351] Phenomenex, Inc. Monolithic HPLC columns; November 2013. Abgerufen unter: <http://www.phenomenex.com/Products/Part/CH0-7643>.
- [352] Pecher HS. Entwicklung eines neuartigen epoxidbasierten Monolithen, Diplomarbeit. Humboldt-Universität zu Berlin; 2010.
- [353] Willcocks D, Onyon L, Jenkins C, Diver B. Triglycidyl isocyanurate. In: *World Health Organization, Hrsg. Concise international chemical assessment*. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft; 1998. S. 1–21.
- [354] Vargha V. Binary solid-liquid phase diagram of the two diastereomer racemates of triglycidyl isocyanurate (TGIC). *Eur Polym J.* 2007;43:4762–4769.
- [355] Ziemann O, Krauser J, Zamzow PE, Daum W. Entwicklung der POF. In: *POF - optische Polymerfasern für die Datenkommunikation*. Berlin: Springer-Verlag; 2001. S. 57–94.
- [356] ChemgaPedia. Transporterscheinungen; Oktober 2013. Abgerufen unter: [http://www.chemgapedia.de/vsengine/vlu/vsc/de/ch/1/pc/pc\\_09/pc\\_09\\_01/pc\\_09\\_01\\_01.vlu/Page/vsc/de/ch/1/pc/pc\\_09/pc\\_09\\_01/pe\\_09\\_01\\_02.vscml.html](http://www.chemgapedia.de/vsengine/vlu/vsc/de/ch/1/pc/pc_09/pc_09_01/pc_09_01_01.vlu/Page/vsc/de/ch/1/pc/pc_09/pc_09_01/pe_09_01_02.vscml.html).
- [357] IDEX Health & Science. Tubing. In: *Fluidic products & information for laboratory applications*; 2011-2012. S. 64.
- [358] Berruex LG, Freitag R, Tennikova TB. Comparison of antibody binding to immobilized group specific affinity ligands in high performance monolith affinity chromatography. *J Pharm Biomed Anal.* 2000;24:95–104.
- [359] Wikimedia Foundation Inc. Protein A; Dezember 2013. Abgerufen unter: [http://de.wikipedia.org/wiki/Protein\\_A](http://de.wikipedia.org/wiki/Protein_A).



- [360] Ernst-Cabrera K, Wilchek M. High-performance affinity chromatography. *TrAC, Trends Anal Chem.* 1988;7:58–63.
- [361] BIA Separations d.o.o. IgG and IgM Purification and Quantitation, A009; Dezember 2013. Abgerufen unter: <http://www.biaseparations.com/sp/1462/antibodies>.
- [362] RÖMPP Online 4.0, Georg Thieme Verlag KG. Lysin; Dezember 2013. Abgerufen unter: <https://roempp.thieme.de/roempp4.0/do/data/RD-12-01906>.
- [363] Eyerer P. Synthese (Herstellung und Erzeugung) von Kunststoffen. In: Eyerer P, Hirth T, Elsner P, Hrsg. *Polymer engineering - Technologien und Praxis*. Berlin: Springer-Verlag; 2008. S. 19–43.
- [364] Faye C, Chamieh J, Moreau T, Granier F, Faure K, Dugas V, et al. *In situ* characterization of antibody grafting on porous monolithic supports. *Anal Biochem.* 2012;420:147–154.
- [365] Pfaunmiller EL, Hartmann M, Dupper CM, Soman S, Hage DS. Optimization of human serum albumin monoliths for chiral separations and high-performance affinity chromatography. *J Chromatogr A.* 2012;1269:198–207.
- [366] Wiechelman KJ, Braun RD, Fitzpatrick JD. Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: Identification of the groups responsible for color formation. *Anal Biochem.* 1988;175:231–237.
- [367] Tannenbergr R. Entwicklung einer photometrischen Methode zur quantitativen Bestimmung von auf Oberflächen adsorbierten oder kovalent gebundenen Protein-Farbstoff-Konjugaten, Bachelorarbeit. Beuth Hochschule für Technik Berlin; 2013.
- [368] Hermanson GT. Preparation of hapten-carrier immunogen conjugates. In: *Bioconjugate Techniques*. 2. Ed. Amsterdam: Academic Press; 2008. S. 745–782.
- [369] Curry S, Brick P, Franks NP. Fatty acid binding to human serum albumin: New insights from crystallographic studies. *Biochim Biophys Acta.* 1999;1441:131–140.
- [370] BIA Separations d.o.o. CIM® r-Protein A Disk Monolithic Column; Dezember 2013. Abgerufen unter: <http://www.biaseparations.com/pr/257/347/specific-information>.
- [371] Wertetabellen. In: *Formeln und Tabellen*. 12. Ed. Berlin: Duden Paetec Schulbuchverlag; 2005. S. 11.

- [372] Breuer H. Band 1, Allgemeine und anorganische Chemie. In: dtv-Atlas Chemie. 9. Ed. München: Deutscher Taschenbuch Verlag; 2000. S. 6.

# Abbildungsverzeichnis

2.1	Vergleich des Säulenbetts einer mit Partikeln gefüllten Säule mit dem einer monolithischen Säule . . . . .	8
2.2	Mechanismus der Phasenseparation . . . . .	10
2.3	Stereospezifische Epoxidierung durch <i>syn</i> -Addition einer Percarbonsäure an eine ungesättigte Verbindung über einen Spiro-Übergangszustand .	16
2.4	Semipinacol-Umlagerung von Epoxiden zur Carbonylverbindung . . . .	18
2.5	Synthesewege für die Herstellung von Glycidylethern . . . . .	20
2.6	Mechanismus der kationischen Autopolymerisation von Epoxiden . . . .	21
2.7	Mechanismus der anionischen Autopolymerisation von Epoxiden . . . .	22
2.8	Mechanismus der koordinativen Autopolymerisation von Epoxiden . . .	23
2.9	Messbereiche ausgewählter Methoden zur Porengrößenbestimmung . . .	25
2.10	Ablauf und Prinzip einer Quecksilber-Intrusionsporosimetriemessung . .	27
2.11	Klassifizierung der Adsorptionsisothermen nach International Union of Pure and Applied Chemistry . . . . .	29
2.12	Signalentstehung bei einem Environmental Scanning Electron Microscope	33
2.13	Prinzip der Affinitätschromatographie . . . . .	36
2.14	Kovalente Kopplungstechniken für Liganden mit Aminofunktion an ein epoxidbasiertes Trägermaterial . . . . .	40
3.1	Nummerierung der Säulenquerschnitte für die Morphologievisualisierung mittels Environmental Scanning Electron Microscope . . . . .	64
3.2	Kalibriergeraden zur Quantifizierung des in Affinitätsexperimenten eluierten Immunglobulin G . . . . .	79
4.1	Synthese von Pentaerythritoltetraglycidylether ( <b>1</b> ) und die möglichen Nebenprodukte . . . . .	82
4.2	Chromatogramm von Ansatz 1 und 2 der Synthese von Pentaerythritoltetraglycidylether ( <b>1</b> ) . . . . .	84
4.3	Struktur von Glyceroltriglycidylether ( <b>5</b> ) und den Nebenprodukten . . .	85

4.4	Angefertigte Kurzwegvakuumdestillationsapparatur . . . . .	86
4.5	Struktur von Tris(2,3-epoxypropyl)isocyanurat . . . . .	87
4.6	Pulverdiffraktogramm von kommerziell erworbenem Tris(2,3-epoxypropyl)isocyanurat nach einmaliger Aufreinigung durch selektives Lösen von $\alpha$ -TEPIC in Chloroform bei Raumtemperatur . . . . .	90
4.7	Auflichtmikroskop-Aufnahme eines Monoliths, <i>in situ</i> hergestellt mit $\alpha$ -Tris(2,3-epoxypropyl)isocyanurat in einer Edelstahlkapillare (ID 500 $\mu$ m, OD $1/16''$ ) . . . . .	92
4.8	ESEM-Aufnahmen von Monolithen, <i>in situ</i> hergestellt mit $\alpha$ -Tris(2,3-epoxypropyl)isocyanurat mit variierendem Porogenanteil (1,4-Dioxan/Isooctan (4:1)) in Edelstahlkapillaren (ID 500 $\mu$ m, OD $1/16''$ ) . . . . .	93
4.9	Aluminiumheizblock mit Nuten und Monolithkapillarsäulen, <i>in situ</i> hergestellt mit $\alpha$ -Tris(2,3-epoxypropyl)isocyanurat mit 65 Vol.-% Porogen (1,4-Dioxan/Isooctan (4:1)) in FEP-Schläuchen (ID 0,8 mm, OD $1/16''$ ) . . . . .	94
4.10	ESEM-Aufnahmen von Säulenquerschnitten einer längs zerteilten Monolithkapillarsäule, <i>in situ</i> hergestellt mit $\alpha$ -Tris(2,3-epoxypropyl)isocyanurat mit 65 Vol.-% Porogen (1,4-Dioxan/Isooctan (4:1)) in einem FEP-Schlauch (ID 0,8 mm, OD $1/16''$ ) in waagerechter Position . . . . .	96
4.11	Technik zur blasenfreien Befüllung von Kapillarsäulen . . . . .	97
4.12	ESEM-Aufnahmen von Säulenquerschnitten einer längs zerteilten Monolithkapillarsäule, <i>in situ</i> hergestellt mit $\alpha$ -Tris(2,3-epoxypropyl)isocyanurat mit 65 Vol.-% Porogen (1,4-Dioxan/Isooctan (4:1)) in einem FEP-Schlauch (ID 0,8 mm, OD $1/16''$ ) in waagerechter Position mit optimierter Befüllungstechnik . . . . .	98
4.13	Quecksilber-Intrusionskurve und Porengrößenverteilung von Monolithkapillarsäulen, <i>in situ</i> hergestellt mit $\alpha$ -Tris(2,3-epoxypropyl)isocyanurat mit 65 Vol.-% Porogen (1,4-Dioxan/Isooctan (4:1)) in einem FEP-Schlauch (ID 0,8 mm, OD $1/16''$ ) . . . . .	99
4.14	Strukturen von GE 100, GE 500 und Polypox R9 . . . . .	101
4.15	Monolithblöcke, hergestellt mit GE 500 bzw. GE 100 in drei verschiedenen Porogenmischungen mit verschiedenen Volumenanteilen . . . . .	103
4.16	ESEM-Aufnahmen von Monolithen, hergestellt mit GE 500 oder GE 100 in verschiedenen Porogenmischungen mit unterschiedlichen Volumenanteilen . . . . .	105

4.17	ESEM-Aufnahmen von Monolithen, hergestellt mit GE 100 in Toluol/Methyl- <i>tert</i> -butylether (3:2, 80 Vol.-%) und Bortrifluoridetherat (1:2) bzw. mit GE 500 in 1,4-Dioxan/Methyl- <i>tert</i> -butylether (2:3, 80 Vol.-%) und Bortrifluoridetherat (1:2) . . . . .	106
4.18	Ansätze mit GE 500 in Methyl- <i>tert</i> -butylether bzw. 1,4-Dioxan als Poren mit variierendem Volumenanteil . . . . .	108
4.19	ESEM-Aufnahmen von Monolithen, hergestellt mit GE 500 in 1,4-Dioxan/Methyl- <i>tert</i> -butylether (3:2) mit variierenden Porogenvolumenanteilen . . . . .	109
4.20	Porengrößenverteilungen von Monolithen, hergestellt mit GE 500 in 1,4-Dioxan/Methyl- <i>tert</i> -butylether (3:2) mit variierendem Porogenvolumenanteil . . . . .	110
4.21	Monolithscheiben für die Härtemessung nach SHORE A . . . . .	112
4.22	Lagerung von Kapillarsäulen während der Präparation . . . . .	113
4.23	Ansätze für Synthese von Monolithdisks mit PVC-Schläuchen . . . . .	114
4.24	Apparativer Aufbau für die Herstellung von Monolithdisks in einem Inline-Solvent-Filter . . . . .	115
4.25	Monolithdisks in Inline-Solvent-Filtern . . . . .	116
4.26	Chromatogramm von eluiertem Immunglobulin G aus Kaninchenserum mit Monolithkapillarsäule . . . . .	117
4.27	Chromatogramme von eluiertem Immunglobulin G aus Kaninchenserum mit Monolithdisks, hergestellt mit GE 500 . . . . .	120
4.28	Strukturen der als Comonomere eingesetzten Diepoxide 1,3-Butandiendiepoxid, Ethylenglycoldiglycidylether, 1,4-Butandioldiglycidylether . . . . .	124
4.29	Reaktionen zur Bestimmung des Epoxidgehalts durch Titration . . . . .	125
4.30	Monolithblöcke, hergestellt mit Monomermischungen aus GE 500 und 1,4-Butandioldiglycidylether, Ethylenglycoldiglycidylether oder 1,3-Butandiendiepoxid mit variierendem Anteil . . . . .	128
4.31	Härten nach SHORE A von Monolithen, hergestellt mit Monomermischungen aus GE 500 und 1,4-Butandioldiglycidylether, Ethylenglycoldiglycidylether oder 1,3-Butandiendiepoxid mit variierendem Anteil . . . . .	130
4.32	ESEM-Aufnahmen von Monolithen, hergestellt mit Monomermischungen aus GE 500 und 1,4-Butandioldiglycidylether, Ethylenglycoldiglycidylether oder 1,3-Butandiendiepoxid mit variierendem Anteil . . . . .	132
4.33	Porengrößenverteilungen von Monolithen, hergestellt mit GE 500 und 1,4-Butandioldiglycidylether mit variierendem Anteil in 75 Vol.-% Poren (1,4-Dioxan/Methyl- <i>tert</i> -butylether (3:2)) . . . . .	134

4.34	Porengrößenverteilungen von Monolithen, hergestellt mit GE 500 und Ethylenglycoldiglycidylether mit variierendem Anteil in 75 Vol.-% Porogen (1,4-Dioxan/Methyl- <i>tert</i> -butylether (3:2)) . . . . .	135
4.35	Porengrößenverteilungen von Monolithen, hergestellt mit GE 500 und 1,3-Butadiendiepoxid mit variierendem Anteil in 75 Vol.-% Porogen (1,4-Dioxan/Methyl- <i>tert</i> -butylether (3:2)) . . . . .	135
4.36	Monolithdisk in Inline-Solvent-Filter, hergestellt mit GE 500 und 60 % 1,3-Butadiendiepoxid in 75 Vol.-% Porogen, ca. 19 Wochen nach ihrer Präparation . . . . .	136
4.37	Chromatogramme von eluiertem Immunglobulin G aus Kaninchenserum mit einer Monolithdisk, hergestellt mit GE 500 und 60 % 1,3-Butadiendiepoxid . . . . .	138
4.38	Bicinchoninsäure-Tests . . . . .	139
4.39	Synthese des Rinderserumalbumin-Nitrothiobenzoessäure-Konjugats sowie die reduktive Abspaltung von 2-Nitro-5-thiobenzoat . . . . .	140
A.1	Massenspektren (ESI+) der Fraktionen von Ansatz 1 der Synthese von Pentaerythritoltetraglycidylether ( <b>1</b> ) . . . . .	149
A.2	Massenspektren (ESI+) der Fraktionen von Ansatz 2 der Synthese von Pentaerythritoltetraglycidylether ( <b>1</b> ) . . . . .	150
A.3	Massenspektren (ESI+) der dritten Fraktion von Ansatz 2 der Synthese von Pentaerythritoltetraglycidylether ( <b>1</b> ) . . . . .	152
A.4	Massenspektrum (ESI+) vom unaufgereinigten Ansatz 1 der Synthese von Glyceroltriglycidylether ( <b>5</b> ) . . . . .	153
A.5	Massenspektren (ESI+) von Ansatz 2 der Synthese von Glyceroltriglycidylether ( <b>5</b> ) vor und nach Destillation im Vakuum . . . . .	153
A.6	Chromatogramme von kommerziell erworbenem Tris(2,3-epoxypropyl)isocyanurat und $\alpha$ -Tris(2,3-epoxypropyl)isocyanurat . . . . .	154
A.7	Diffraktogramme von kommerziell erworbenem Tris(2,3-epoxypropyl)isocyanurat, unaufgereinigt und aus Methanol umkristallisiert . . . . .	156
A.8	Quecksilber-Intrusionskurven von Monolithen, hergestellt mit GE 500 und Monomermischungen aus GE 500 und 1,4-Butandioldiglycidylether, Ethylenglycoldiglycidylether oder 1,3-Butadiendiepoxid mit variierendem Anteil in 75 Vol.-% Porogen (1,4-Dioxan/Methyl- <i>tert</i> -butylether (3:2))	158
A.9	$^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von 1,3-Butadiendiepoxid . . . . .	159
A.10	$^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von Ethylenglycoldiglycidylether . . . . .	160
A.11	$^1\text{H}$ , $^1\text{H}$ -COSY-Spektrum von Ethylenglycoldiglycidylether . . . . .	160

---

A.12	$^1\text{H}$ -NMR von 1,4-Butandiol diglycidylether . . . . .	161
A.13	$^1\text{H}$ , $^1\text{H}$ -COSY-Spektrum von 1,4-Butandiol diglycidylether . . . . .	161
A.14	$^1\text{H}$ -Spektrum der dritten Fraktion von Ansatz 2 der Synthese von Pen- taerythritoltetraglycidylether ( <b>1</b> ) . . . . .	162
A.15	$^1\text{H}$ -Spektrum von Ansatz 2 der Synthese von Glyceroltriglycidylether ( <b>5</b> ) vor und nach destillativer Aufreinigung im Vakuum . . . . .	162
A.16	$^1\text{H}$ -Spektrum von Ansatz 3 der Synthese von Glyceroltriglycidylether ( <b>5</b> ) nach säulenchromatographischer Aufreinigung . . . . .	163
A.17	$^1\text{H}$ -Spektrum von Glycerol, Ansatz 3 der Synthese von Glyceroltrigly- cidylether ( <b>5</b> ) nach säulenchromatographischer Aufreinigung und Epi- chlorhydrin . . . . .	163
A.18	$^{13}\text{C}$ , $^1\text{H}$ -COSY-Spektrum von Ansatz 3 der Synthese von Glyceroltriglyci- dylether ( <b>5</b> ) nach säulenchromatographischer Aufreinigung . . . . .	164
A.19	$^1\text{H}$ -Spektrum von GE 100 . . . . .	164





# Tabellenverzeichnis

3.6	Mischungsverhältnisse der Monomere GE 100 und GE 500 mit drei Porogenmischungen zusammengesetzt aus 1,4-Dioxan, Methyl- <i>tert</i> -butylether und Toluol mit unterschiedlichen Volumenanteilen . . . . .	65
3.7	Mischungsverhältnisse von Monomer GE 500 mit variierenden Volumenanteilen der Porogene 1,4-Dioxan bzw. Methyl- <i>tert</i> -butylether . . . . .	66
3.8	Mischungsverhältnisse von Monomer GE 500 mit variierenden Volumenanteilen der Porogenmischung 1,4-Dioxan/Methyl- <i>tert</i> -butylether (2:3) .	67
3.9	Monomermischungsverhältnisse von GE 500 mit 1,4-Butandioldiglycidylether, Ethylenglycoldiglycidylether oder 1,3-Butadiendiepoxid in Abhängigkeit des Diepoxidanteils . . . . .	68
3.10	Mengen eingesetzter Reagenzien für die Hydrochlorierung . . . . .	69
3.11	Mischungsverhältnisse von Monomer GE 500 mit variierenden Volumenanteilen der Porogenmischung 1,4-Dioxan/Methyl- <i>tert</i> -butylether (2:3) für die Härtebestimmung nach SHORE A . . . . .	72
3.12	Monomermischungsverhältnisse von GE 500 mit 1,4-Butandioldiglycidylether, Ethylenglycoldiglycidylether oder 1,3-Butadiendiepoxid in Abhängigkeit des Diepoxidanteils für die Härtebestimmung nach SHORE A . . .	72
3.13	Verdünnungen für Kalibriergerade A und injizierte Massen von Immunglobulin G . . . . .	78
3.14	Verdünnungen für Kalibriergerade B und injizierte Massen von Immunglobulin G . . . . .	78
4.1	Löslichkeiten der Isomere von Tris(2,3-epoxypropyl)isocyanurat . . . . .	88
4.2	Ergebnisse des Porogenscreenings mit Mischungen bestehend aus Toluol, 1,4-Dioxan und Methyl- <i>tert</i> -butylether mit unterschiedlichen Porogenanteilen . . . . .	102

4.3	Poröse Eigenschaften von Monolithen, hergestellt mit GE 500 in 1,4-Dioxan/Methyl- <i>tert</i> -butylether (3:2) mit variierendem Porogenvolumenanteil . . . . .	110
4.4	Kapazitäten von Monolithdisks, hergestellt mit GE 500 . . . . .	121
4.5	Epoxidäquivalentgewichte alternativer polyfunktioneller Glycidylether .	122
4.6	Durch Titration bestimmte Epoxidäquivalentgewichte von GE 500, 1,4-Butandioldiglycidylether, Ethylenglycoldiglycidylether und 1,3-Butadien- diepoxid . . . . .	126
4.7	Poröse Eigenschaften von Monolithen, hergestellt mit GE 500 und 1,4- Butandioldiglycidylether, Ethylenglycoldiglycidylether bzw. 1,3-Butadien- diepoxid mit variierendem Anteil . . . . .	133

# Abkürzungsverzeichnis

AIBN	Azo- <i>bis</i> (isobutyronitril)
äq.	Äquivalent
ATRP	Atom Transfer Radical Polymerization
BACM	4-[(4-Aminocyclohexyl)methyl]cyclohexan
BADGE	Bisphenol-A-diglycidylether
BAM	Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung
BCA	Bicinchoninsäure-Assay
BDE	1,3-Butadiendiepoxyd
BDG	1,4-Butandiol diglycidylether
BET-Modell	Modell nach Brunauer, Emmett und Teller
BMA	Butylmethacrylat
BSA	Bovine Serum Albumin (Rinderserumalbumin)
CDI	1,1'-Carbonyldiimidazol
CEC	Capillary Electrochromatography (Kapillarelektrochromatographie)
CIM®	Convective Interaction Media
COSY	Correlation Spectroscopy
CZE	Capillary Zone Electrophoresis (Kapillarzonen elektrophorese/Kapillarelektrophorese)
DAD	Diodenarraydetektor
DIN	Deutsches Institut für Normung e. V.
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DSC	Di( <i>N</i> -succinimidyl)-carbonat
DTNB	5,5'-Dithio- <i>bis</i> (2-nitrobenzoesäure)
DTT	Dithiothreitol
EDG	Ethylenglycoldiglycidylether
EDMA	Ethylendimethacrylat

EEW in [g äq. <sup>-1</sup> ]	Epoxy Equivalent Weight (Epoxidäquivalentgewicht)
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ELSD	Evaporative Light Scattering Detector (Verdampfungs-Lichtstreuendetektor)
EN in [äq./100 g]	Epoxy Number (Epoxidwert)
EN	Europäische Norm
ESEM	Environmental Scanning Electron Microscope
ESI	Elektrosprayionisation
ETFE	Ethylen-Tetrafluorethylen
<b>F<sub>ab</sub></b>	<i>Antigen-binding</i> Fragment (Antigen-bindendes Fragment)
<b>F<sub>c</sub></b>	<i>crystallizable</i> Fragment (kristallisierbares Fragment)
FEP	Fluorinated Ethylene Propylene (Perfluorethylenpropylen)
GC	Gaschromatographie
GDCh	Gesellschaft Deutscher Chemiker e. V.
GE 100	Glycidylether 100, Glyceroltriglycidylether
GE 500	Glycidylether 500, Polyglycerolpolyglycidylether
GMA	Glycidylmethacrylat
GPC	Gel-Permeationschromatographie
HILIC	Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography (hydrophile Interaktionschromatographie)
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
HRMS	High Resolution Mass Spectrometry hochauflösende Massenspektrometrie
HUB	Humboldt-Universität zu Berlin
ICDD	The International Centre for Diffraction Data
ID	Inner Diameter (Innendurchmesser)
IgG	Immunglobulin G
IRHD	Internationaler Gummihärtegrad
ISEC	Inverse Size Exclusion Chromatography (Inverse Gel-Permeationschromatographie)
ISO	International Organization for Standardization
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
LC	Liquid Chromatography (Flüssigchromatographie)
MALDI	Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization (Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation)

---

MCPBA	<i>m</i> -Chlorperbenzoesäure
MS	Massenspektrometrie
MTBE	Methyl- <i>tert</i> -butylether
NMR	Nuclear Magnetic Resonance (kernmagnetische Resonanz)
NP	Normalphase
OD	Outer Diameter (Außendurchmesser); Optische Dichte
PBS	Phosphate buffered Saline (phosphatgepufferte Salzlösung)
PEEK	Polyetheretherketon
PEG	Polyethylenglycol
PP	Polypropylen
PS	Polystyrol
PTFE	Polytetrafluorethylen
PVC	Polyvinylchlorid
REM	Rasterelektronenmikroskop
RNS	Ribonukleinsäure
ROMP	Ring-Opening Metathesis Polymerisation (Ringöffnungsmetathese)
RP	Reversed-Phase Chromatography (Umkehrphasenchromatographie)
RT	Raumtemperatur
Sdp.	Siedepunkt
SEC	Size Exclusion Chromatography (Größenausschlusschromatographie)
TEMPO	2,2,6,6-Tetramethylpiperidinyloxy
TEOS	Tetraethoxysilan
TEPIC	Tris(2,3-epoxypropyl)isocyanurat
TETRAD-C	1,3-Bis( <i>N,N'</i> -diglycidylaminomethyl)cyclohexan
TFA	Trifluoressigsäure
TMOS	Tetramethylorthosilicat
TNB	2-Nitro-5-thiobenzoessäure
TOF	Time-of-Flight (Flugzeitanalysator)
unl	unlöslich
UV	Ultraviolettstrahlung
Vis	visible (sichtbares Licht)
VWD	Variabler Wellenlängendetektor

## Formelzeichen, Symbole und Konstanten

$a_m$	[nm <sup>2</sup> ]	Flächenbedarf eines Gasmoleküls
$C$		BET-Konstante
$c_{HCl}$	[mol L <sup>-1</sup> ]	Konzentration Salzsäure
$c_{NaOH}$	[mol L <sup>-1</sup> ]	Konzentration Natronlauge
$d_p$	[µm]	Partikelgröße
$g$	9,81 m s <sup>-2</sup> [371]	Normalfallbeschleunigung
$K_0$		Konstante in DARCY-Gleichung
$K_D$		Gleichgewichtsdissoziationskonstante
$K_S$		Säuredissoziationskonstante
$L$	[m]	Säulenlänge
lg		Logarithmus zur Basis 10
$M$	[g mol <sup>-1</sup> ]	Molmasse
$M_r$		relative Molmasse
$m$	[g]	Probemasse
$N_A$	6,022 · 10 <sup>23</sup> mol <sup>-1</sup> [372]	AVOGADRO-Konstante
$n$	[mol]	Stoffmenge
$p$	[Pa]	Druck; Druck des Adsorptivs
$p_0$	[Pa]	Sättigungsdampfdruck des Adsorptivs
$p_0/p_s$		Relativdruck
pH		= -lg([H <sup>+</sup> ])
$pK_S$		= -lg( $K_S$ )
$R$	8,314 J K <sup>-1</sup> mol <sup>-1</sup> [372]	universelle Gaskonstante; gebundener organischer Rest
$R_h$	[nm]	hydrodynamischer Radius
$R_n$	[m]	Porenradius
$r_K$	[nm]	Kelvinradius
$r_p$	[nm]	Porenradius
$S$	[m <sup>2</sup> ]	Fläche einer Probe
$S_m$	[m <sup>2</sup> g <sup>-1</sup> ]	spezifische Oberfläche
$S_N1/S_N2$		nukleophile Substitution nach monomolekularem bzw. bimolekularem Mechanismus
$T$	[K]	Temperatur
$t$	[nm]	Schichtdicke des Adsorbats
$t_R$	[min]	Retentionszeit

---

$u$	$[\text{m s}^{-1}]$	Flussgeschwindigkeit
$V$	$[\text{L}]$	Volumen
$V_a$	$[\text{m}^3]$	adsorbiertes Gasvolumen (Adsorbat)
$V_e$	$[\text{m}^3]$	Elutionsvolumen
$V_{HCl}$	$[\text{mL}]$	Volumen hinzugegebener Salzsäure
$V_i$	$[\text{m}^3]$	interpartikuläres Porenvolumen
$V_M$	$[\text{m}^3]$	Volumen der adsorbierten monomolekularen Schicht
$V_m$	$[\text{m}^3 \text{ mol}^{-1}]$	molares Volumen
$V_n$	$[\text{m}^3]$	partielles Volumen von Pore mit $R_n$
$V_{NaOH}$	$[\text{mL}]$	Volumen hinzugegebener Natronlauge
$V_q$	$[\text{m}^3]$	intrudiertes Quecksilbervolumen
$V_s$	$[\text{m}^3]$	Säulenvolumen
$W$	$[\text{Nm}]$	Arbeit
$\epsilon_e/\epsilon_i/\epsilon_t$		externe/interne/totale Porosität
$\eta$	$[\text{Ns m}^{-2}]$	Viskosität der mobilen Phase
$\lambda$	$[\text{nm}]$	Wellenlänge
$\sigma$	$[\text{Nm}^{-1}]$	Oberflächenspannung
$\vartheta$	$[\text{°}]$	Kontaktwinkel
$\rho$	$[\text{g cm}^{-3}]$	Dichte





# Publikationen

## Zeitschriftenartikel

Pecher HS, Zimathies A, Weller MG. Oligoepoxide-based monoliths: Synthesis and application as affinity capillary column for enrichment of immunoglobulin G. *Macromol Chem Phys* 2012;213:2398-2403.

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/macp.201200206/abstract>

## Poster

Pecher HS, Carvalho JJ, Schneider RJ, Weller MG, Panne U. Characterization of protein conjugates by capillary zone electrophoresis (CZE) using dynamic self-coating materials. ANAKON 2009; 17.-20. März 2009; Berlin, Deutschland.

Pecher HS, Zimathies A, Weller MG. Epoxy-based monolith as support for affinity chromatography. 2. Berliner Chemie Symposium; 04. April 2012; Berlin, Deutschland.

Pecher HS, Weller MG. Development of an epoxide-based monolith for affinity chromatography. MSS 2012 5th Monolith Summer School and Symposium; 01.-06. Juni 2012; Portorož und Ajdovščina, Slowenien.

Pecher HS, Weller MG. Preparation of an epoxide-based monolithic capillary column for enrichment of immunoglobulin G by affinity chromatography. Potsdam Days on Bioanalysis 2012; 08. November 2012; Potsdam, Deutschland.

Pecher HS, Weller MG. Entwicklung und Charakterisierung eines monolithischen Trägermaterials für die Affinitätschromatographie. GDCh-Wissenschaftsforum Chemie 2013; 01.-04. September 2013; Darmstadt, Deutschland.

Berlin, den \_\_\_\_\_

Heike Pecher



# Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig angefertigt sowie keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Alle wörtlich oder sinntensprechend aus anderen Veröffentlichungen übernommenen Stellen habe ich als solche gekennzeichnet. Diese Arbeit wurde in dieser oder ähnlicher Form bisher in keinem anderen Promotionsverfahren im In- oder Ausland vorgelegt.

Berlin, den \_\_\_\_\_

Heike Pecher

\_\_\_\_\_